



**Phytoremédiation par Jardins Filtrants d'un sol pollué
par des métaux lourds : Approche de la
phytoremédiation dans des casiers végétalisés par des
plantes de milieux humides et étude des mécanismes de
remobilisation/immobilisation du zinc et du cuivre**

Tatiana Kirpichtchikova

► **To cite this version:**

Tatiana Kirpichtchikova. Phytoremédiation par Jardins Filtrants d'un sol pollué par des métaux lourds : Approche de la phytoremédiation dans des casiers végétalisés par des plantes de milieux humides et étude des mécanismes de remobilisation/immobilisation du zinc et du cuivre. Géochimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. <tel-00505033>

HAL Id: tel-00505033

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00505033>

Submitted on 22 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

OBSERVATOIRE DE GRENOBLE
LABORATOIRE DE GEOPHYSIQUE INTERNE ET TECTONOPHYSIQUE
LABORATOIRE DE GEODYNAMIQUE DES CHAINES ALPINES

THESE

présentée par

Tatiana Kirpichtchikova

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I

Spécialité : Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement

Ecole Doctorale : « Terre-Univers-Environnement »

Phytoremédiation par *Jardins Filtrants* d'un sol pollué par des métaux lourds

Approche de la phytoremédiation dans des casiers végétalisés par des plantes de milieux humides et étude des mécanismes de remobilisation/immobilisation du zinc et du cuivre

soutenue le 29 Septembre 2009

devant le jury composé de

Laurence DENAIX	Directeur de recherche INRA, Bordeaux	Rapporteur
Philippe HINSINGER	Directeur de recherche INRA, Montpellier	Rapporteur
Christophe SCHWARTZ	Professeur ENSAIA, Nancy	Examineur
Yves PERRODIN	Directeur de recherche ENTPE, Lyon	Examineur
Thierry JACQUET	PDG, PHYTORESTORE, Paris	Invité
Alain MANCEAU	Directeur de recherche CNRS, Grenoble	Directeur de thèse

*La vie est la force géochimique la plus puissante
sur la surface terrestre... Elle pénètre les processus
chimiques les plus grandioses... Il n'est pas de grand
équilibre chimique où l'influence de la vie ne se manifeste,
marquant toute la chimie de son sceau ineffaçable.*

*Lors de sa vie, de sa mort et de sa destruction,
l'organisme vivant restitue à la biosphère ses atomes
et les lui reprend incessamment, mais la matière vivante
pénétrée de vie puise toujours sa genèse au sein
de la vie elle-même.*

V. Vernadsky, 1926, La Biosphère

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein des équipes de LGIT et LGCA de Grenoble en collaboration avec Phytorestore. Il a par ailleurs bénéficié du soutien financier de la Région Ile-de-France. Ainsi, vais-je exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont d'une manière ou d'une autre contribué à la réalisation de ce travail et qui m'ont apporté leur soutien.

Tout d'abord, un grand merci à Phytorestore qui m'a permis de réaliser ce projet tant d'un point de vue financier que matériel. Grâce à cette entreprise, j'ai pu bénéficier d'une grande liberté de travail et grâce au soutien de toute l'équipe de Grenoble, j'ai pu disposer d'un encadrement scientifique exigeant et avec une grande rigueur méthodologique. Je me réjouis donc d'avoir pu vivre cette rencontre qui a créé des échanges féconds entre la recherche et l'industrie.

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance envers Philippe Hinsinger et Laurence Denaix, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que le président du jury, Christophe Schwartz, et également Yves Perrodin, qui ont bien voulu me faire partager leurs conseils et leur réflexion sur ce travail.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Alain Manceau, pour m'avoir formée aux méthodes passionnantes d'analyse des sols au niveau moléculaire sur la source synchrotron, et pour la confiance qu'il m'a accordée. Un grand merci ici aussi à Bruno Lanson pour son encadrement scientifique, sa disponibilité à toute épreuve et sa grande ouverture d'esprit.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide pour mener à bien ce travail. Je pense notamment à Géraldine Sarret, Martine Lanson, Frédéric Panfili, Lorenzo Spadini, Laurent Charlet, Nicolas Geoffroy, Matthew Marcus, Sirine Fakra, Clément Falk, Sébastien Pairs, Olivier Proux, Jean-Jacques Menthonnex, Jean-Louis Hazemann. Merci aussi aux directeurs de l'Ecole Doctorale « Terre-Univers-Environnement », Anne-Marie Boullier, Christophe Ferrari, et tout particulièrement à Etienne Jaillard, pour leur disponibilité et leur soutien.

Un détour par la Russie pour adresser toute mon affection et ma reconnaissance à Arkady Neiman, professeur et ami, qui m'avait formée à la chimie physique et la chimie du solide et qui m'a encouragée depuis lors et tout au long de mon parcours. Une pensée dans ce sens aussi pour les collègues bordelais. Une pensée toute particulière pour Tamara Chibrik saluant son courage et son immense expérience en réhabilitation des technosols par les plantes depuis plus de quarante ans.

Je salue ici, du fond du cœur, Thierry Jacquet, l'inventeur des Jardins Filtrants. Ce travail n'aurait certainement jamais existé sans ta rencontre et la passion des plantes que tu as su me transmettre. Merci pour tes idées prodigieuses, ton enthousiasme et ta volonté. Je suis pour ma part convaincue que « la nature fait bien les choses si on sait la cultiver dans son jardin... un jardin filtrant évidemment ». Que la présentation des Jardins Filtrants à l'Exposition Universelle de 2010 à Shanghai soit bien une graine du changement qui va éclore demain.

Merci à ma famille et à mes amis.

RESUME

MOTS-CLES : phytoremédiation, jardins filtrants, phytolixiviation, phytotransformation, phytodétoxication, sol, rhizosphère, spéciation, métaux lourds, zinc, cuivre, plomb, zinc métallique, cuivre métallique, nanoparticules, *Phragmites australis*, *Iris pseudacorus*, *Salix viminalis*, citrate, chélatants, XRF, EXAFS

Phytoremédiation par Jardins Filtrants d'un sol pollué par des métaux lourds

De nombreuses études en phytoremédiation visent à accroître le prélèvement des métaux par les plantes pour dépolluer les sols. Ce travail porte sur une nouvelle approche de phytoremédiation appelée *Jardins Filtrants* qui consiste à traiter le sol dans des casiers végétalisés par des plantes de milieux humides (*Phragmites australis*, *Iris pseudacorus* et *Salix viminalis*) et irrigués de manière à imposer une alternance des conditions hydromorphie-assèchement afin d'accroître la solubilité de métaux dans le sol et de les extraire par lixiviation. Dans une expérience pilote de seize mois, cette approche a été appliquée pour la phytoremédiation de Zn, Cu et Pb d'un sol agricole fortement pollué par l'épandage d'eaux usées. Le bilan de masse des métaux dans les systèmes sol-plante a montré que seule une quantité non-significative des métaux a été accumulée dans la biomasse des plantes. Une quantité importante des métaux a été éliminée du sol *via* la *phytolixiviation* résultant de l'interaction de l'activité racinaire avec l'irrigation. Un traitement chimique complémentaire au citrate permet d'augmenter la lixiviation. Les mécanismes de transformations de Zn et Cu impliqués dans cette phytoremédiation ont été mis en évidence par combinaison des techniques analytiques sur la source synchrotron à micro- (μ XRF, μ XRD, μ EXAFS) et macro-échelle (EXAFS) couplée aux analyses chimiques, permettant d'identifier et quantifier les formes des métaux dans le sol. Dans le sol initial, le zinc a été majoritairement sous formes de minéraux secondaires (Zn-ferrihydrite, Zn-phosphate et Zn-phylosilicate modélisé par Zn-kérolite) et le cuivre a été associé essentiellement à la matière organique. L'activité racinaire dans les conditions hydromorphie-assèchement a profondément modifié la spéciation des métaux. Zn-ferrihydrite, une des formes majoritaires de Zn, a été complètement dissoute. La dissolution réductive de cet oxyhydroxyde de fer, favorisée par les conditions d'hydromorphie, a induit la lixiviation de Zn. Une partie de Zn solubilisé a coprécipité avec Fe en un autre oxyhydroxyde de fer zincifère moins soluble, Zn-goethite substituée, dans les conditions oxydantes et avec assistance des racines formant des plaques de goethite en défense contre l'excès de métaux dissous. De plus, les nouvelles particules de Zn métallique et ZnO ont été découvertes dans la rhizosphère, en faible quantité. L'oxydation de la matière organique a induit l'excès de Cu cationique toxique. En réponse au stress oxydant, ce cuivre a été biotransformé par les racines en association avec des mycorhizes en nanoparticules de Cu métallique, en quantité importante. Ce nouveau mode de biominéralisation peut être typique des plantes de milieux humides. Cette nouvelle voie de phytoremédiation implique principalement la *phytolixiviation* induisant la solubilisation des métaux et leur lixiviation et la *phytotransformation*, due pour une part à la *phytodétoxication*, conduisant la conversion des métaux toxiques en formes peu solubles.

ABSTRACT

KEYWORDS : phytoremediation, filtering gardens, phytoleaching, phytotransformation, phytodetoxication, soil, rhizosphere, speciation, heavy metals, zinc, copper, lead, metallic zinc, metallic copper, nanoparticles, *Phragmites australis*, *Iris pseudacorus*, *Salix viminalis*, citrate, chelants, XRF, EXAFS

Phytoremediation of Metal Contaminated Soil by *Filtering Gardens*

Numerous studies in phytoremediation have tried to increase the uptake of metals by plants for soil cleanup. This work is about a new phytoremediation approach named *Filtering Gardens* using common wetland plants (*Phragmites australis*, *Iris pseudacorus* and *Salix viminalis*) in the vegetated cells irrigated so as to impose periodic flooding-drying conditions for enhancing the solubility of metals in the soil and their removal through leaching. In a pilot-scale sixteen-month experiment, this approach was applied for phytoremediation of Zn, Cu and Pb from an agricultural soil highly contaminated by sewage disposal. Metal mass balances for soil-plant systems showed that only a non-significant amount of metals was accumulated in plant tissues. An important amount of metals was removed from the soil *via phytoleaching* resulting from the interaction of plant roots with irrigation. An additional chemical treatment with citrate can enhance metal leaching. Mechanisms of Zn and Cu transformations involved in this phytoremediation were highlighted by combining synchrotron-based X-ray analytical tools at micro- (μ XRF, μ XRD, μ EXAFS) and macro-scale (EXAFS) coupled with chemical analyses, allowing to determine the nature and amount of metal forms in the soil. In the initial soil, zinc was occurred mainly as secondary minerals (Zn-ferrihydrite, Zn-phosphate and Zn-kerolite-like-phylllosilicate) and copper was essentially bound to organic matter. The activity of plant roots under flooding-drying conditions clearly modified the original speciation of metals. In the phytoremediated soil, Zn-ferrihydrite, one of the initially major forms of Zn, was entirely dissolved. The reductive dissolution of this iron oxyhydroxide favored by flooding conditions was the major process inducing Zn leaching. One part of solubilized Zn coprecipitated with Fe into another less soluble iron oxyhydroxide, Zn-substituted goethite, under oxidizing conditions and with assistance by plant roots likely in defense against toxic dissolved metals, as evidenced by the formation of goethite plaques on and near roots. Moreover, the newly occurred particles of metallic Zn and ZnO were discovered in the rhizosphere, in small amount. The oxidation of organic matter likely enhanced by root oxygen release caused an excess of toxic cationic Cu. In response to oxidative stress, this Cu was biotransformed into metallic Cu nanoparticles, in important amount, by plant roots with evidence of assistance by endomycorrhizal fungi. This newly identified mode of metal biomineralization by plant roots may be typical of common wetland plants. This new way of making phytoremediation involves mainly *phytoleaching* inducing the solubilization of metals in the soil and their leaching and *phytotransformation*, due in part to *phytodetoxication*, driving the conversion of toxic metals into weakly soluble forms.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. Synthèse bibliographique	7
I.1. Les polluants métalliques dans le sol	7
I.1.1. Définitions d'un sol pollué	7
I.1.2. Spéciation et mobilité des éléments métalliques dans le sol	11
I.1.3. Mécanismes de séquestration des éléments métalliques dans les sols.....	12
I.1.4. Impact des propriétés physico-chimiques et des constituants du sol sur la spéciation des métaux	14
I.2. Les effets de la plante sur la spéciation et la mobilité des métaux.....	17
I.2.1. Interactions sol-plante dans la rhizosphère	18
I.2.1.1. Changement des concentrations ioniques.....	19
I.2.1.2. Changement du pH.....	20
I.2.1.3. Changement des conditions redox	20
I.2.1.4. Complexation des métaux avec des exsudats racinaires	21
I.2.2. Mécanismes de prélèvement et d'accumulation des métaux dans la plante	22
I.2.2.1. Absorption par les racines	22
I.2.2.2. Transfert radial vers le xylème.....	24
I.2.2.3. Transport dans les organes aériens	25
I.2.3. Interactions au niveau de l'écosystème sol - plante	26
I.3. La phytoremédiation	27
I.3.1. Les concepts et les avantages	28
I.3.2. Les limites.....	32
I.3.3. Les stratégies pour accroître la phytodécontamination	33
I.4. Conclusion & Hypothèses	37
CHAPITRE II. Matériels & Méthodes	39
II.1. Site pollué de la plaine de Pierrelaye	40
II.1.1. L'historique	40
II.1.2. Caractéristiques de la pollution.....	42
II.2. Approche originale de la phytoremédiation	44
II.2.1. Principes de la phytoremédiation par <i>Jardins Filtrants</i>	44

II.2.2. Configuration et instrumentation du site pilote.....	46
II.3. Prélèvements, préparations et analyses des échantillons	51
II.3.1. Options méthodologiques	51
II.3.2. Sol initial avant phytoremédiation	52
II.3.3. Sol après phytoremédiation	53
II.3.4. Plantes.....	57
II.3.5. Lixiviats	57
II.4. Approche moléculaire de la spéciation	58
II.4.1. Localisation des métaux par micro-fluorescence X sur rayonnement synchrotron (μ SXRF)	58
II.4.2. Identification des phases porteuses par micro-diffraction X (μ XRD)	59
II.4.3. Identification et quantification des espèces chimiques par spectroscopie EXAFS et micro-EXAFS (μ EXAFS)	59
 CHAPITRE III. Spéciation des métaux dans le sol initial & Solubilité des métaux in vitro avec des chélatants	 63
Article : Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling, paru dans <i>Geochimica et Cosmochimica Acta</i>	64
 CHAPITRE IV. Bilan de la phytoremédiation	123
IV.1. Effet du traitement sur le sol	124
IV.1.1. Effet global au niveau du compartiment végétalisé	124
IV.1.2. Effet sur le sol au niveau du système racinaire	132
IV.2. Phytoaccumulation des métaux.....	135
IV.3. Phytolixiviation des métaux	139
IV.4. Conclusion.....	146
 CHAPITRE V. Evolution de la spéciation du zinc suite à la phytoremédiation	149
V.1. Localisation des métaux.....	151
V.2. Identification des espèces du zinc	154
V.2.1. μ EXAFS	154
V.2.2. Analyse en composantes principales	162

V.3. Spéciation quantitative du zinc.....	164
V.4. Mécanismes de remobilisation/immobilisation du zinc.....	170
CHAPITRE VI. Evolution de la spéciation du cuivre suite à la phytoremédiation.....	181
Article : Formation of Metallic Copper Nanoparticles at the Soil - Root Interface, paru dans <i>Environmental Science & Technology</i>	182
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	213
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	229
ANNEXE. Spectroscopie EXAFS, micro-EXAFS et micro-fluorescence X sur rayonnement synchrotron	257

INTRODUCTION

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, la pollution des sols par des métaux lourds a augmenté suite à l'accroissement de la population, l'urbanisation, l'expansion des activités industrielles et agricoles. Les sols sont des ressources limitées et considérées comme non renouvelables à l'échelle humaine. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par l'héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel et urbain. Les sols ne sont pas isolés, ils font partie de l'écosystème (Jenny, 1980). L'accumulation dans les sols des métaux lourds, qui sont par nature non dégradables et potentiellement toxiques, augmente le risque d'exposition des êtres vivants : microorganismes, plantes, animaux, et l'homme, qui se situe en fin de chaîne alimentaire. Il est donc primordial non seulement de mieux connaître les facteurs essentiels contrôlant la mobilité et la biodisponibilité des métaux dans les sols, mais aussi de développer des solutions de réhabilitation efficaces et durables visant à limiter les risques liés à la pollution métallique, et à restaurer et à préserver les ressources en sols.

Afin de pallier les limites environnementales, économiques et sociétales des méthodes conventionnelles, qui sont actuellement employées pour le traitement des sols pollués telles que l'incinération et le confinement, les recherches s'orientent depuis une quinzaine d'années vers les nouvelles méthodes biologiques de traitement des sols, basées sur l'utilisation des plantes. Ces méthodes, qui se regroupent sous le terme de phytoremédiation, apparaissent comme des voies alternatives, moins coûteuses, plus extensives et plus respectueuses des sols et de l'environnement (Cunningham and Berti, 1993; Raskin et al., 1994b; Salt et al., 1995). La phytoremédiation peut prendre plusieurs

orientations, dont deux principales et conceptuellement différentes pour le traitement de la pollution métallique sont la phytostabilisation et la phytoextraction. Les techniques de phytostabilisation utilisent le couvert végétal, avec ou sans apport d'amendements fixateurs, afin de réduire la mobilité des métaux, et dans l'idéal, de les immobiliser *in situ* dans le sol, et de réduire ainsi les risques de dispersion des métaux dans les milieux environnants (Mench et al., 1994b; Vangronsveld et al., 1995; Mench et al., 2003; Panfili et al., 2005). Cependant, les métaux demeurent dans le sol, et leur évolution à long terme n'est pas prévisible. La dépollution nécessite l'élimination des métaux du sol. C'est ainsi que la phytoextraction utilise les capacités des plantes à prélever des métaux du sol, et à les transporter et concentrer dans leurs parties aériennes, qui seront ensuite récoltées et traitées. Malgré leur développement récent, les techniques de phytoextraction sont variées et des résultats encourageants ont d'ores et déjà été obtenus pour le traitement de la pollution métallique (Raskin, 1996; Blaylock et al., 1997; Robinson et al., 1997; Anderson et al., 1998; Ebbs and Kochian, 1998; Robinson et al., 1998; Blaylock, 2000; Kayser et al., 2000; Lombi et al., 2001; Schwartz et al., 2003; Wenzel et al., 2003; Luo et al., 2006; Schwartz et al., 2006; Evangelou et al., 2007; Komárek et al., 2007; Komárek et al., 2008). L'essor de la phytoremédiation est particulièrement marqué outre-Atlantique, où une vingtaine de brevets a été déposée au cours de ces dernières années (Cunningham, 1994; Raskin et al., 1994a; Chaney et al., 1998; Raskin et al., 1998; Terry et al., 2003). Cependant, à l'heure actuelle, le principal obstacle à l'affirmation de ces techniques de dépollution par les plantes pour le traitement des sols à l'échelle industrielle est le temps de traitement, qui est généralement assez long, et peut varier de quelques années à quelques dizaines d'années selon le cas (Cunningham and Berti, 1993; Blaylock et al., 1997; McGrath, 1998; Salt et al., 1998). En effet, la plupart des plantes métallobytophytes connues sont caractérisées par un enracinement peu profond, une croissance lente, une faible biomasse et une spécificité pour un seul métal, autant de critères qui limitent considérablement les rendements prévisibles de dépollution. Par ailleurs, un rendement optimal nécessite que les conditions de culture *in situ* sur les sites pollués correspondent aux exigences naturelles des plantes utilisées, ce paramètre est par essence très difficile à contrôler, et représente une contrainte supplémentaire de la technique. L'apport des réactifs chélatants permet, dans certains cas, d'induire l'accumulation des métaux dans les plantes métallotolérantes à forte biomasse, et d'augmenter ainsi le rendement de phytoremédiation (Blaylock et al., 1997; Chen et al., 2003). Cependant, l'apport des chélatants favorise également la lixiviation des métaux du sol. Leur application *in situ* présente donc des risques de migration des métaux dans l'environnement (Anderson, 2005). Par conséquent, un effort de recherche est nécessaire aujourd'hui pour mieux comprendre les mécanismes intervenant dans le système sol-plante, afin d'optimiser les

processus de phytoremédiation, dans l'objectif d'élaborer des techniques de phytoremédiation efficaces et généralisables à l'échelle industrielle.

Ce travail s'inscrit dans cet esprit, en proposant une étude basée à la fois sur le développement d'une solution de phytoremédiation conceptuellement nouvelle et originale, dans l'objectif de pouvoir obtenir une dépollution satisfaisante des sols pour une large gamme des métaux et dans un temps de traitement raisonnable, et sur la compréhension des mécanismes de transformations des métaux intervenant dans le système sol-plante lors de la phytoremédiation. L'approche originale de la phytoremédiation que nous proposons ici est celle du procédé de *Jardins Filtrants*[®], qui est basé principalement sur l'utilisation des plantes de milieux humides, et a été mis au point par l'entreprise française Phytorestore (<http://www.phytorestore.com>). Cette approche se développe depuis plusieurs années. De nombreux « jardins filtrants » ont été déjà réalisés, comme des espaces paysagers dédiés à la dépollution, sur des sites pollués des industriels et des collectivités locales, en France et à l'étranger. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un grand projet industriel entrepris par Phytorestore, dans l'optique de l'élaboration d'un premier Centre de phytoremédiation selon le procédé de Jardins Filtrants pour la dépollution des matrices solides (sols, sédiments, boues).

Face au problème posé par la pollution polymétallique des terres agricoles de la plaine de Pierrelaye, suite à l'épandage massif et prolongé des eaux usées non traitées, des projets de recherche sur les risques de cette pollution et sur la possibilité de réhabilitation de ces terres ont été lancés par la Région Ile-de-France. Plusieurs études sur les risques de transfert des métaux dans la chaîne alimentaire et de migration des métaux vers les eaux souterraines, ainsi que sur le potentiel de phytoremédiation de ces terres ont été effectuées par des équipes de l'INRA (programme EPANDAGRI) (Baize et al., 2002; Schmitt-Sirguez, 2004; Bourennane et al., 2006; Dère et al., 2006a; Dère et al., 2006b; Lamy et al., 2006; Schwartz et al., 2006; Dère et al., 2007). Pour notre part, dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé un sol issu de la plaine de Pierrelaye pour l'étude de la phytoremédiation selon le procédé de Jardins Filtrants à l'échelle d'un site pilote.

L'originalité de ce travail réside dans le fait qu'il présente une étude complète et approfondie des différents processus impliqués dans la phytoremédiation du sol, avec une approche multi-échelles et multi-techniques. D'une part, la phytoremédiation est abordée au niveau d'un site pilote, en conditions réelles et en vraie grandeur, avec plusieurs plantes, en caractérisant à la fois les teneurs des métaux dans le sol, l'accumulation des métaux dans les plantes et la lixiviation des métaux du sol. D'autre part, la phytoremédiation est abordée

ici au niveau des formes chimiques et structurales des métaux sous lesquelles ils se trouvent dans le sol, i. e. la spéciation. Ce dernier aspect constitue le cœur de ce travail portant sur l'analyse par des investigations poussées à l'échelle moléculaire de la spéciation originelle des métaux dans le sol avant phytoremédiation et des changements de la spéciation induits par la phytoremédiation, permettant ainsi de comprendre comment les interactions dans le système sol-plante contrôlent les transformations biogéochimiques des métaux. Peu d'études en phytoremédiation des sols pollués par des métaux lourds ont porté sur les formes des métaux dans le sol et leur évolution sous les effets de la plante, et seul l'aspect macroscopique du transfert des métaux était généralement abordé. Or, la connaissance des formes des métaux est essentielle, car c'est la forme du métal qui détermine sa mobilité et sa biodisponibilité pour la plante, et l'incorporation d'un métal dans le sol et son transfert impliquent *in fine* un changement de la spéciation dans le sol. La connaissance des formes des métaux dans le sol est aussi incontournable, car à la différence des polluants organiques, les métaux ne sont pas dégradables, et c'est essentiellement sur leurs formes qu'on peut jouer pour réhabiliter un sol pollué. Une attention particulière est portée dans ce travail à l'identification des formes des métaux à l'interface sol-plante, et plus précisément au niveau de la rhizosphère, i.e. le volume de sol qui entoure des racines et qui est directement influencé par leur activité (Darrah, 1993; Hinsinger, 1998a). En effet, le transfert des métaux à partir du réservoir qu'est le sol global vers la plante a lieu dans la rhizosphère. C'est une zone d'intenses interactions physiques, chimiques et biologiques entre les racines, le sol et les microorganismes qui peuvent modifier les conditions physico-chimiques du sol global, et par conséquent, la spéciation des métaux, leur mobilité chimique et leur biodisponibilité (Hinsinger, 1998a). Peu d'études en spéciation des éléments métalliques dans les sols ont été effectuées à ce jour sur ce sol rhizosphérique, la majorité des travaux ayant été conduite sur le sol global, en maintenant un état d'équilibre entre les constituants solides du sol et les éléments métalliques. Pourtant, si l'on s'intéresse à l'impact de la plante sur la mobilité des métaux, il faut considérer le déséquilibre du système dans la zone d'influence racinaire. La croissance de la plante induit en effet les flux d'eau et de solutés à l'interface sol-racine, modifiant ainsi la composition de la solution du sol dans l'environnement racinaire. Les racines respirent, absorbent l'eau, les nutriments et les polluants métalliques, libèrent des ions et des ligands organiques (protons, acides organiques, enzymes, etc.). Enfin, l'activité microbienne dans la rhizosphère conduit également à l'excrétion d'agents complexants extracellulaires. Ces différentes actions modifient les conditions physico-chimiques du milieu et influencent ainsi la spéciation des métaux dans le sol, et l'absorption, le transport et l'accumulation des métaux dans la plante. La compréhension approfondie des mécanismes de remobilisation et de rétention des métaux à l'interface sol-racine est un enjeu important

de connaissance fondamentale et pour l'optimisation des différents aspects de la phytoremédiation.

Ce travail porte principalement, et à la fois, sur le zinc et le cuivre. Bien que le zinc dans les sols soit déjà étudié d'une manière approfondie, peu de données sont disponibles sur la spéciation et le comportement géochimique du cuivre dans les sols. La spéciation de ces deux éléments dans le sol est étudiée ici avec une approche de caractérisation directe, au niveau moléculaire, par l'utilisation conjointe des techniques physiques d'analyse sur les sources synchrotron, en particulier la micro-fluorescence X (μ SXRF), la micro-diffraction X (μ XRD) et la spectroscopie EXAFS et micro-EXAFS (μ EXAFS). Cette approche originale, développée récemment pour l'application en sciences de l'environnement, est particulièrement performante pour l'étude des matrices naturelles telles que les sols et les sédiments, qui sont toujours complexes, hétérogènes et polyphasiques (Manceau et al., 2000a; Isaure et al., 2002; Manceau et al., 2002b; Roberts et al., 2002; Juillot et al., 2003; Manceau et al., 2003; Roberts et al., 2003; Manceau et al., 2004; Sarret et al., 2004; Isaure et al., 2005; Panfili et al., 2005). L'intérêt principal de ces techniques de micro-analyses repose essentiellement sur la taille réduite et la grande intensité du faisceau X permettant de sonder un volume réduit (quelques dizaines de μm^3) d'échantillon du sol. Ainsi, la résolution micrométrique de ces techniques est bien adaptée aux échelles d'hétérogénéité du sol et permet de localiser, *in situ* dans la matrice non-perturbée du sol, et à l'échelle microscopique, les associations géochimiques des métaux dans le sol, d'accéder à leur composition chimique et à leur nature minéralogique (μ SXRF, μ XRD) et d'identifier, idéalement individuellement, les formes chimiques et structurales des métaux (μ EXAFS). La spectroscopie EXAFS à l'échelle macroscopique permet de quantifier les différentes formes des métaux dans le volume de sol. Cette approche analytique, employée pour l'étude de la spéciation des métaux dans le sol avant phytoremédiation et dans le sol après phytoremédiation, permet d'acquérir une connaissance quasi complète de l'ensemble des formes des métaux dans le sol, et ainsi de mettre en évidence les transformations biogéochimiques des métaux induites par les effets des plantes.

Ce manuscrit est composé de six chapitres. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur la spéciation et la mobilité des polluants métalliques dans les sols, les mécanismes de leur séquestration dans les sols, les effets des plantes dans la rhizosphère et leur impact sur la spéciation et la mobilité des métaux, ainsi que sur les techniques actuelles de phytoremédiation des sols pollués par des métaux. Le second chapitre est consacré aux matériels et méthodes, et en particulier, à la description de l'historique et des caractéristiques de la pollution du sol de la plaine de Pierrelaye, utilisé

pour la phytoremédiation dans ce travail, puis à l'approche nouvelle et originale de phytoremédiation utilisée dans ce travail et au dispositif de traitement mis en œuvre sur un site pilote, ensuite à la stratégie d'échantillonnage et d'analyse des échantillons, et enfin à la démarche analytique de l'étude de la spéciation des métaux dans le sol. Le troisième chapitre est le premier des quatre chapitres de résultats et discussion, et porte sur l'étude de la spéciation originelle des métaux dans le sol à l'état initial et sur l'étude de la solubilité des métaux *in vitro* avec des chélatants organiques : EDTA, EDDS et citrate. Le quatrième chapitre dresse un bilan de la phytoremédiation sur le site pilote en termes de concentrations totales. Dans ce chapitre nous nous sommes efforcés de calculer la balance de masse des métaux dans les systèmes sol-plante afin de déterminer comment les métaux sont répartis entre le sol, les plantes et les lixiviats. Le cinquième chapitre est dédié à l'étude de la spéciation résiduelle et l'évolution de la spéciation du zinc dans la phase solide du sol suite à la phytoremédiation. Le sixième chapitre est le parallèle du précédent sur le zinc, et présente l'évolution de la spéciation du cuivre suite à la phytoremédiation. Le manuscrit se termine par une synthèse des principaux résultats et des principales conclusions tirées de ce travail, en mettant en relation les comportements biogéochimiques du zinc et du cuivre, et des apports de cette nouvelle approche en matière de phytoremédiation, en abordant quelques unes de ses perspectives.

CHAPITRE I. Synthèse bibliographique

I.1. Les polluants métalliques dans le sol

I.1.1. Définitions d'un sol pollué

La lithosphère se compose à 99 % de 10 éléments (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti et P). Le terme « éléments traces » désigne tous les autres éléments, métaux et non métaux (ex. As), présents à l'état de traces (< 0.1 %) dans la croûte terrestre. Par commodité, le terme « métal » ou « élément métallique » sera employé dans la suite de ce manuscrit pour désigner les éléments traces, bien que tous les éléments traces ne soient pas des métaux.

Le sol constitue une interface entre la lithosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère. Il s'est formé à partir des roches et comprend des constituants secondaires minéraux ou organiques dotés de propriétés spécifiques. Les éléments métalliques présents dans les roches se concentrent au cours de la pédogenèse dans certains horizons et constituent des stocks d'origine naturelle, appelés fonds géochimiques, qui préexistent dans le profil avant toute intervention humaine. D'après Baize (2000), le fond géochimique naturel local résulte de phénomènes naturels géologiques et pédologiques. Les teneurs en métaux des fonds géochimiques peuvent être extrêmement variables (Tableau I.1).

Il est indispensable de bien différencier le stock des éléments métalliques d'origine naturelle (géogène), constituant le fond géochimique local, de celui qui résulte de contamination d'origine humaine (anthropogène). Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives, ils se fixent sur les

constituants secondaires des sols (argiles, oxyhydroxydes de Fe, Mn etc., matière organique, etc.) et entraînent de ce fait des risques très supérieurs par rapport aux métaux d'origine naturelle, qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes.

Tableau I.1. Gammes de fonds géochimiques (en mg/kg).

	Roches¹	Sols français²
Cu	5 - 90	2 -20
Zn	20 - 120	10 - 100
As	0.1 - 13	1 - 25
Cd	0.05 - 0.22	0.05 - 0.45
Hg	0.004 - 0.29	0.02 -0.1
Pb	3 - 24	9 - 50

¹ Alloway (1995), ² Baize (2000).

Différentes définitions d'un sol pollué sont présentes dans la littérature. D'après Juste (1988), le terme « contamination » doit être employé pour les sols lorsqu'il y a des apports anthropiques importants mais sans effet apparent pour l'environnement. En revanche, le terme « pollution » est plus approprié lorsque des apports liés à des activités humaines ont des effets négatifs visibles sur l'environnement. Pour Ramade (1993), le contaminant est un polluant présent à des quantités décelables dans l'environnement. Rivière (1998) définit le polluant comme un élément dangereux susceptible de présenter un risque pour les milieux et les organismes vivants. Les termes « polluant » et « contaminant » sont la plupart du temps synonymes, et dans la suite de ce manuscrit, nous emploierons indifféremment l'un ou l'autre.

La gestion des sols pollués sur le moyen et le long terme est importante, car les sols, comme l'eau, sont des ressources limitées et font partie du patrimoine national. Dans l'optique d'engager une politique de traitement des sites et des sols pollués, le Ministère de l'Environnement a recensé pour la première fois en 1994 près de 700 sites pollués sur le territoire français. Un site pollué est défini comme « un site dont le sol, le sous sol, ou les eaux souterraines ont été pollués par d'anciens dépôts de déchets ou par l'infiltration de substance polluante, cette pollution étant susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou pour l'environnement » (Ministère de l'Environnement, 1994). Les sites pollués résultant des activités industrielles font désormais l'objet de recensement dans deux bases de données : Basias, une base qui recense plus de 300 000 sites potentiellement pollués du fait de leur type d'activité (<http://basias.brgm.fr>), et Basol,

une base plus restreinte portant sur les sites effectivement pollués qui comprend 4033 sites à l'état de 2007 (<http://basol.ecologie.gouv.fr>).

Des normes fixant les teneurs limites en métaux lourds dans les sols ont été définies dans divers pays (Allemagne, Pays Bas, Suisse, Canada, etc.). En France, cependant, les seuls textes réglementaires relatifs à la teneur des métaux lourds dans les sols sont le décret n°97-113 du 8 décembre 1997 accompagné de l'arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues issues du traitement des eaux usées sur les sols agricoles. L'arrêté du 8 janvier 1998 stipule notamment les teneurs maximales autorisées en métaux dans les boues et dans les sols susceptibles d'accueillir ces boues (Tableau I.2). C'est un repère réglementaire très restreint. C'est pourquoi, en absence d'une norme française ayant un domaine d'application plus étendu, les critères les plus communément utilisés pour juger si un sol est significativement contaminé ou pas proviennent des normes néerlandaises. Ces normes peuvent être employées à titre indicatif, car elles ont été établies dans le contexte des sols hollandais de nature pédologique peu variée, et qui ne ressemblent que peu à la grande diversité des sols français.

Tableau I.2. Teneurs limites en éléments métalliques dans les boues et dans les sols susceptibles de recevoir ces boues, selon l'arrêté du 8 janvier 1998 (J.O. n°26 du 31 janvier 1998).

	Valeur limite dans les boues (mg/kg MS)	Valeur limite dans les sols (mg/kg MS)
Cd	10	2
Cr	1000	150
Cu	1000	100
Hg	10	1
Ni	200	50
Pb	800	100
Zn	3000	300

En France, aujourd'hui encore, faute de référentiel plus approprié, il est souvent fait usage des Valeurs de Définitions de Source - Sol (VDSS) et des Valeurs de Constat d'Impact (VCI) pour statuer de la présence « anormale ou non » du polluant dans les sols. Ces valeurs sont des valeurs guides préconisées uniquement dans le cadre de l'évaluation simplifiée des risques. La VDSS indique la concentration du polluant dans le sol, en dessus de laquelle le sol est considéré comme pouvant être source de pollution. La VCI relative aux sols est une valeur guide permettant de constater l'impact de la pollution du milieu, en

fonction de son usage. Ces valeurs prennent en compte les risques chroniques pour la santé des populations liées à l'usage actuel des sites. Les VDSS et VCI sont établies en France par les autorités régionales et ne sont pas des valeurs réglementaires (Tableau I.3). Ces valeurs sont souvent utilisées à titre indicatif comme guide de sélection des substances pour le calcul des risques. Cependant, ces valeurs ne peuvent pas être utilisées comme seuil de dépollution ou de réhabilitation des sols.

Le seul référentiel qui semble être acceptable dans ces conditions est une estimation des fonds pédo-géochimiques, estimation locale ou nationale suivant les possibilités et le contexte. Alors que cette estimation est presque toujours possible pour les sols forestiers et pour les horizons profonds des sols agricoles, elle n'est plus possible pour les horizons de surface labourés qui ont reçu des quantités variables de métaux *via* des fertilisations, amendements, épandages et retombées atmosphériques. Pour ces horizons labourés, seule la notion de « teneur agricole habituelle » est opérationnelle (Baize, 1997a). Une étude complexe des fonds pédo-géochimiques locaux et régionaux dans des sols agricoles français a été réalisée récemment par Baize (programme INRA - ASPITET) durant 1993-2005 afin de constater l'état « normal » des sols agricoles français avant la réalisation des grandes campagnes d'épandage de boues. Cette étude a établi les seuils indicatifs des métaux dans les sols agricoles, en particulier de la région Ile-de-France (Tableau 1.3), au-delà desquels la teneur en éléments métalliques peut représenter les risques. Ces seuils représentent le 95^{ème} percentile de la distribution des concentrations mesurées, c'est-à-dire, tel que 5 % des sols qui ont été étudiés, ont des teneurs supérieures ou égales. Ces seuils ne représentent en aucun cas des seuils de dangerosité. Cependant, ils peuvent être utilisés comme référentiel fiable en matière de la dépollution ou de réhabilitation des sols et en matière d'usage agricole.

Tableau I.3. Seuils indicatifs des éléments métalliques dans les sols (en mg/kg) selon différents critères.

	Baize ¹	VDSS	VCI sol
Cd	0.5	10	20
Cr	65	65	130
Cu	28	95	190
Hg	0.3	3.5	7
Ni	31	70	140
Pb	54	200	400
Zn	88	4500	9000

¹ Baize (programme INRA-ASPITET), valeurs pour les sols agricoles français.

I.1.2. Spéciation et mobilité des éléments métalliques dans le sol

La teneur en élément métallique dans un sol ne peut être une indication suffisante pour évaluer sa mobilité, sa biodisponibilité et sa toxicité pour les organismes vivants (microorganismes, plantes, animaux, hommes). Plus que sa teneur, c'est la forme sous laquelle se trouve l'élément, i.e. la *spéciation*, qui est déterminante : en solution, sous forme ionique ou des complexes, colloïdale, ou sous forme solide, lié à des phases minérales et/ou organiques. Les différentes formes organiques et minérales de l'élément métallique sont en équilibre avec les phases solide et liquide du sol. La spéciation est conditionnée par les caractéristiques physico-chimiques (pH, Eh, CEC, concentrations ioniques, etc.) et minéralogiques du milieu (Baize, 1997b). Les variations de ces conditions gouvernent les multiples réactions d'adsorption/désorption, de précipitation/dissolution, d'oxydation/réduction etc., qui contrôlent le devenir des éléments métalliques (Lindsay, 1979; Mc Bride, 1989).

Les éléments métalliques dans la phase liquide, en solution du sol, sont considérés comme les plus mobiles, biodisponibles et toxiques. La *mobilité chimique* d'un élément métallique dans le sol peut être définie comme son aptitude à être transféré vers des compartiments du sol où il est moins énergétiquement retenu, le compartiment ultime étant représenté le plus souvent par la solution du sol ou, dans certains cas, l'atmosphère du sol (Loué, 1993; Juste et al., 1995). L'élément métallique dans la solution du sol est considéré comme étant potentiellement disponible pour être prélevé par un organisme vivant donné (plante, microorganisme, etc.), autrement dit *biodisponible* (Juste et al., 1995). La *phytobiodisponibilité* d'un élément est alors définie comme son aptitude à être prélevé par les racines végétales (Thornton, 1999).

Les teneurs en éléments métalliques dans la solution du sol sont généralement très faibles. D'après Mench (1990), dans les sols non contaminés, la phase liquide de sols sableux acides, dont le pH est compris entre 2.5 et 4.0, contient en moyenne 11 μM de Cu, et celle de sols calcaires, dont le pH varie de 7.5 à 7.8, contient en moyenne 0.8 μM de Cu. Pour des sols ayant 20 à 30 % d'humidité relative, ces résultats signifient que le cuivre dissous représente en général moins de 1 % du cuivre total (et 10 fois moins encore dans les sols calcaires) (Loué, 1993).

L'influence de la spéciation sur la toxicité d'un élément métallique peut être illustrée par l'étude de Cotter-Howells and Thornton (1991) qui a démontré qu'une population d'enfants peut vivre dans un environnement fortement pollué en plomb sans être contaminée par cet élément, quand il est présent dans le sol sous forme minérale solide et stable, notamment de pyromorphite (ou chloropyromorphite) ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), un phosphate de plomb très stable ($K_{\text{sp}}=10^{-84}$, Nriagu, 1984).

Ces exemples illustrent bien que la détermination de la teneur totale des métaux dans le sol ne reflète pas leur distribution dans le sol et la solution du sol, et surtout que l'essentiel des éléments métalliques dans le sol est lié à la phase solide du sol (Gupta and Chen, 1975; Davies, 1992; Juste et al., 1995). Puisque les formes géochimiques des métaux ont des propriétés physiques et chimiques variées, la détermination de la teneur totale en métaux ne fournit qu'une information partielle sur les interactions possibles avec les différents constituants du sol et, *in fine*, sur leur mobilité. De fait, il est nécessaire de déterminer la spéciation des métaux dans la phase solide puisque c'est elle qui alimente la fraction soluble. La *spéciation* des éléments métalliques est définie ici comme la nature et l'abondance des différentes phases porteuses à l'état solide. Celles-ci sont responsables de la rétention des métaux dans les sols (Tessier et al., 1979).

Les minéraux secondaires, comme les argiles et les oxyhydroxydes de Fe et de Mn, ainsi que la matière organique évoluée (humus) sont les principaux constituants solides du sol qui contribuent au piégeage des polluants métalliques comme Zn, Cu et Pb (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Alloway, 1995). Les éléments métalliques se répartissent parmi l'ensemble des constituants suivant leur degré d'affinité. Le zinc, par exemple, a une forte affinité pour les argiles et oxyhydroxydes de Fe et de Mn. Le cuivre est le plus souvent et majoritairement fixé par la matière organique peu évoluée telle que les débris végétaux grossiers. Les polluants métalliques peuvent également être présents dans les réseaux cristallins d'autres minéraux secondaires comme les carbonates, les sulfures, les phosphates et certains oxydes (Das et al., 1995). Enfin, ces éléments peuvent se trouver sous forme de minéraux primaires d'origine anthropique, issus notamment de l'exploitation minière, ou naturelle, appartenant au fond géochimique (willémite, franklinite, ...) (Alloway, 1995).

I.1.3. Mécanismes de séquestration des éléments métalliques dans les sols

Les métaux s'associent aux constituants minéraux et organiques des sols. Le statut cristallochimique de l'élément métallique dans sa phase porteuse solide, minérale ou organique, dans le sol peut recouvrir des formes très diverses, à travers de nombreux mécanismes de séquestration. Certains d'entre eux, et plus particulièrement les mécanismes de fixation sur les surfaces minérales, sont illustrés sur la figure I.1.

Un élément métallique peut former à la surface d'un minéral un complexe dont la stabilité dépend de la nature de l'interaction entre l'espèce adsorbée et les atomes de surface du substrat. Lorsque l'ion est retenu en surface par des forces électrostatiques, il conserve sa sphère d'hydratation et peut être facilement remobilisé, et donc lessivé. On

parle alors d'adsorption non spécifique sous forme de complexe de sphère externe ou de la physisorption (a).

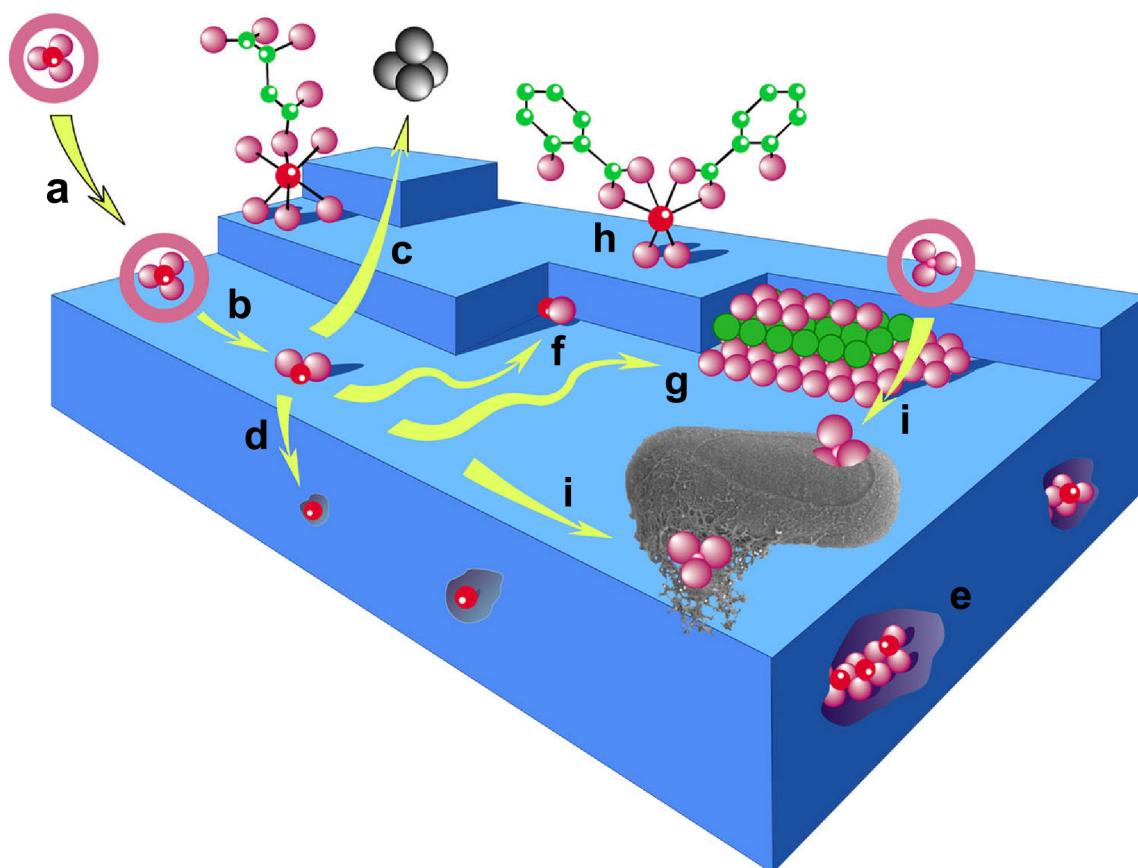


Figure I.1. Principaux mécanismes de fixation d'un ion à l'interface minéral-solution
(d'après Manceau et al., 2002b).

L'ion peut également perdre une partie de sa sphère d'hydratation et former une liaison chimique plus ou moins covalente avec les atomes de surface. Il s'agit alors d'adsorption spécifique ou de chimisorption (b). Le complexe de sphère interne qui en résulte est alors plus difficilement soluble. Un autre scénario souvent rencontré est la diffusion de l'élément au sein de l'espèce hôte et son inclusion soit dans des sites lacunaires (d), soit sa substitution aux ions du réseau cristallin, on parle alors de substitution isomorphe. La diffusion latérale rapide peut conduire à l'adsorption de l'ion sur une face de croissance du minéral (f) ainsi qu'à la précipitation de nouvelle phase en contact avec la

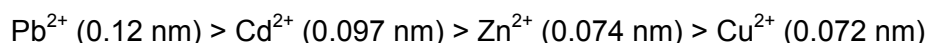
surface (g). Enfin, l'ion adsorbé sur la surface minérale peut éventuellement se détacher (c) et repasser en solution suite, par exemple, à des réactions redox de surface ou d'un équilibre dynamique (Charlet and Manceau, 1993; Manceau et al., 2002b). L'occlusion d'un élément trace au sein du réseau cristallin (e) de la phase porteuse est un mécanisme peu réversible qui nécessite le plus souvent une dissolution du minéral porteur pour remobiliser l'élément en question. Outre leur fixation à la surface des phases minérales, les éléments métalliques peuvent également être complexés par la matière organique du sol. Selon le poids moléculaire des molécules organiques, ces complexes sont solubles ou insolubles. La matière organique elle-même, comme les substances humiques et fulviques, est souvent associée avec les minéraux argileux et les oxydes, du fait de leur richesse en groupements fonctionnels carboxyles, phénols et hydroxyles (Mc Carthy and O'Cinneide, 1974; Murray and Linder, 1984; Shuman, 1988). Dans ce cas, les éléments métalliques sont immobilisés dans des complexes organo-minéraux (h). Enfin, les éléments métalliques peuvent également former des complexes avec des exopolymères et des parois cellulaires des organismes biotiques (i).

Dans la majorité des cas, les constituants du sol sont susceptibles de piéger des éléments métalliques par au moins l'un des mécanismes décrits ci-dessus. Le comportement des métaux dans les sols pollués va donc dépendre de la nature et de la proportion de ces différentes phases, mais également des propriétés physico-chimiques du sol, et en particulier de la solution en contact avec chacun des constituants.

I.1.4. Impact des propriétés physico-chimiques et des constituants du sol sur la spéciation des métaux

En résumé, les éléments métalliques du sol peuvent être présents dans les différentes formes cristallichimiques suivantes : (i) sous forme d'ions libres (hydratés) ou de complexes dissous dans la solution de sol ; (ii) sous forme d'ions échangeables à la surface des minéraux ; (iii) associés à la matière organique ; (iv) associés (occlus ou adsorbés) à des oxy(hydroxy)des, carbonates, phosphates et autres minéraux secondaires ; (v) et substitués dans le réseau cristallin des minéraux primaires (Viets, 1962; Soon and Bates, 1982; Lake et al., 1984). La plupart de ces formes se trouvant en équilibre entre elles, ces équilibres peuvent être modifiés suite à une perturbation des conditions physico-chimiques du milieu (pH, Eh, concentration des métaux et des ligands, quantité d'eau, température, etc.) (Viets, 1962). De plus, le mécanisme cristallichimique de rétention n'est pas forcément unique, bien qu'il existe généralement une ou deux formes majoritaires.

L'**adsorption non spécifique** aussi dénommée physisorption ou plus communément échange ionique, est une réaction réversible contrôlée par la diffusion, la stœchiométrie et l'affinité de l'ion pour l'adsorbant. Les cations en solution chargés positivement sont attirés par des forces électrostatiques coulombiennes par les charges négatives portées par les constituants du sol. Ces charges de surface proviennent soit de substitutions isomorphiques dans le réseau cristallin (remplacement d'un cation trivalent par un cation divalent, par exemple), soit de réactions chimiques de surface. Afin de maintenir l'électroneutralité du système, la charge négative portée par un solide est compensée par celle d'une quantité équivalente de cations. La présence de ces contre-ions à la surface du solide forme une «couche diffuse», qui avec la surface constitue la double couche électrique. Le cation reste entouré de sa sphère de molécules d'eau d'hydratation : il est soit retenu à la surface par des interactions purement électrostatiques et reste localisé dans la «couche diffuse», soit retenu par des liaisons hydrogènes sur un site réactionnel de surface pour former, accompagné de sa sphère d'hydratation, un complexe de sphère externe avec la surface du solide. Ces complexes correspondent à la formation de paire d'ions en solution. L'association formée entre l'ion adsorbé et le solide est faible. En raison de cette faible association, les cations adsorbés de façon non-spécifique sont facilement échangés par d'autres cations en solution, par des réactions d'échange par exemple en modifiant la force ionique. D'après la loi de Coulomb, l'affinité d'échange augmente avec la valence de l'ion et, à charge égale, le cation ayant le plus grand rayon non hydraté est préférentiellement adsorbé (Alloway, 1995). L'ordre suivant est ainsi obtenu pour les éléments traces métalliques :



Les forces électrostatiques et les liaisons hydrogènes étant relativement faibles, les éléments métalliques formant des complexes non-spécifiques sont facilement mobilisables lors de changements des conditions physico-chimiques du milieu. Ils peuvent être solubilisés par un apport d'ions compétiteurs présentant de plus grande affinité pour le constituant considéré.

L'**adsorption spécifique** aussi dénommée chimisorption, consiste en la formation de liaisons iono-covalentes entre l'élément et les ligands de surface. Il n'y a plus de molécule d'eau interposée entre le groupe fonctionnel de surface et l'ion adsorbé, et ce complexe de surface est dit «de sphère interne».

Puisque l'adsorption spécifique conduit à l'hydrolyse des ions métalliques, elle est fortement dépendante du pH. Comme les éléments métalliques en solution ont le plus

souvent une charge positive, ils établiront plus facilement des liaisons chimiques avec les surfaces déprotonnées, et donc chargées négativement, comme celles des oxydes de fer et de manganèse (Alloway, 1995). Cependant, à la différence de l'adsorption non-spécifique, l'adsorption spécifique peut s'effectuer contre le gradient électrostatique, et donc sur les surfaces minérales de même charge que l'ion adsorbé. Cette réaction d'adsorption peut être décrite de la façon suivante :



La valeur de pK (constante d'équilibre) de la réaction d'hydrolyse (1) détermine l'efficacité de l'adsorption des éléments métalliques (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Généralement, l'adsorption spécifique augmente quand la valeur de pK diminue : Cd (pK = 10.1) < Ni (pK = 9.9) < Co (pK = 9.7) < Zn (pK = 9.0) << Cu (pK = 7.7) < Pb (pK = 7.7) < Hg (pK = 3.4). Dans le cas du cuivre et du plomb pour lesquels les valeurs de pK sont semblables, le métal ayant le rayon ionique le plus grand (Pb) est plus fortement adsorbé (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

Dans les complexes de sphère interne, l'ion métallique perd une partie de ses molécules d'eau d'hydratation qui l'entourent en solution au profit de ligands hydroxyles, carbonates, phénols ou carboxyles de surface, avec lesquels il forme une liaison chimique par «partage» d'atome d'oxygène. Après avoir été adsorbé à la surface d'un minéral, l'élément métallique peut diffuser à l'intérieur du minéral.

La **complexation** des métaux par des ligands inorganiques (phosphate, carbonate, sulfate, chlorure, etc.) modifie la charge de l'ion, et par conséquent son adsorption sur les constituants du sol. Dans certaines conditions, ces complexes peuvent aussi précipiter. Dans les sols alcalins, les hydroxydes et les carbonates sont ainsi susceptibles de former des complexes avec des ions métalliques même si l'activité de ces métaux en solution reste faible dans de telles conditions (Alloway, 1995; Mc Laughlin et al., 1998). Les ligands organiques solubles peuvent affecter le pouvoir de rétention des ions métalliques par les surfaces minérales au travers de la formation de complexes métal-ligand stables, qui sont susceptibles en particulier de détacher un élément métallique adsorbé sur une surface minérale (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Mc Laughlin et al., 1998). Ce principe est à la base de l'extraction des éléments métalliques par un agent complexant. Si cet agent présente des ligands ayant une plus forte affinité pour les éléments métalliques que celles de la matrice du sol et s'il forme des complexes plus stables que ceux présents dans le sol,

alors les éléments métalliques seront extraits du sol sous forme de complexes solubles avec l'agent complexant.

La **co-précipitation** de plusieurs éléments chimiques s'effectue lorsque le produit de solubilité d'une phase particulière est atteint. C'est ainsi que se forment les minéraux secondaires des sols (argiles, oxydes de Fe et de Mn, carbonates, phosphates, etc.). Le produit de solubilité varie avec la composition chimique, la loi générale étant que les solutions solides sont plus insolubles que les pôles purs. Ce mécanisme est donc favorisé en présence d'éléments métalliques, ceux-ci étant incorporés au réseau cristallin de la phase néoformée.

Devant la complexité des interactions entre les métaux et les constituants du sol, les travaux portant sur les mécanismes de fixation à l'échelle moléculaire sont généralement réalisés sur des constituants modèles. Par conséquent, même s'ils servent de références, ces résultats ne sont pas simplement extrapolables aux conditions naturelles. Dans ce travail nous avons cherché à identifier chacune des formes du zinc et du cuivre dans un sol contaminé en dépit de la complexité chimique et structurale d'un tel milieu.

1.2. Les effets de la plante sur la spéciation et la mobilité des métaux

Le concept de biodisponibilité a été introduit pour rendre compte du fait que seule une fraction des éléments présents dans le sol est susceptible d'être absorbée par un organisme vivant donné. La biodisponibilité est un concept pour lequel on ne peut donner de définition générique simple (Harmsen et al., 2005). En effet, les définitions qui sont données par les différents auteurs découlent de leurs sensibilités et de leurs domaines scientifiques. Une définition officielle et assez large de la biodisponibilité est donnée par l'ISO : « La biodisponibilité est le degré avec lequel les contaminants chimiques présents dans un sol peuvent être absorbés ou métabolisés par un humain ou un récepteur écologique ou sont disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques » (ISO/DIS 11074). Il faut noter toutefois que le concept de biodisponibilité s'applique à l'acquisition de nutriments autant qu'à la contamination d'organismes vivants par les produits toxiques, quelle que soit leur nature. Pour le système sol-plante, la biodisponibilité d'un élément peut être définie comme son aptitude à être prélevé par les racines des plantes (Juste et al., 1995; Thornton, 1999).

Il est admis que 16 éléments minéraux (C, H et O étant exclus) sont indispensables aux plantes : 6 éléments constituent les nutriments majeurs, nécessaires en quantités élevées (*macro-éléments*) : N, K, P, Ca, Mg, S, et 10 autres constituent des nutriments mineurs, consommés généralement en faibles quantités (*oligo-éléments*) : Fe, Mn, B, Zn, Cu, Mo, Cl, Na, Ni et Co, dont les 4 derniers sont essentiels seulement pour certaines espèces végétales. D'autres éléments tels que, par exemple, Pb, Cd, Hg sont dits « non essentiels », car bien que présents dans les plantes, ils ne participent à aucune fonction physiologique ou biochimique connue (Marschner, 1995). Excepté l'azote gazeux présent dans l'atmosphère du sol et utilisable sous cette forme par les légumineuses, les éléments sont prélevés par les racines des plantes essentiellement à l'état de solutés dans la solution du sol. La ressource en éléments à la surface de la racine se renouvelle continuellement, à la fois par le flux de masse et par la diffusion. L'*absorption* est le processus physiologique qui implique le franchissement de la membrane plasmique des cellules racinaires et qui permet ainsi l'entrée d'un élément dans la plante, à partir de la solution du sol. Cependant, dans les sols, pour la plupart des éléments, ce processus ne constitue pas l'étape limitante en matière de nutrition minérale (Marschner, 1995). L'*acquisition* des éléments est un concept plus large qui recouvre l'absorption, mais également l'ensemble des processus découlant de l'action de la plante et permettant aux différents constituants solides du sol de réapprovisionner la solution du sol en éléments, ainsi que les processus de transfert jusqu'à la surfaces des racines (Hinsinger, 1998a).

I.2.1. Interactions sol-plante dans la rhizosphère

L'interface sol-racine, avec le cortège de microorganismes associés, apparaît comme le premier lieu d'interactions entre les éléments métalliques et la plante. Le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire se définit sous le terme de *rhizosphère* (Darrah, 1993; Hinsinger, 1998a). Ce volume de sol varie selon la nature des plantes, en particulier l'extension du système racinaire et ses propriétés de surface, les éléments considérés et les propriétés physico-chimiques du sol (Alloway, 1995). Pour les éléments peu mobiles, la rhizosphère se limite au(x) premier(s) millimètre(s) de sol situé(s) autour des racines (Hinsinger, 1998a).

L'activité racinaire modifie les paramètres physico-chimiques du sol dans la rhizosphère, et par conséquent, la spéciation des éléments métalliques (Hinsinger, 2001) (Figure I.2).

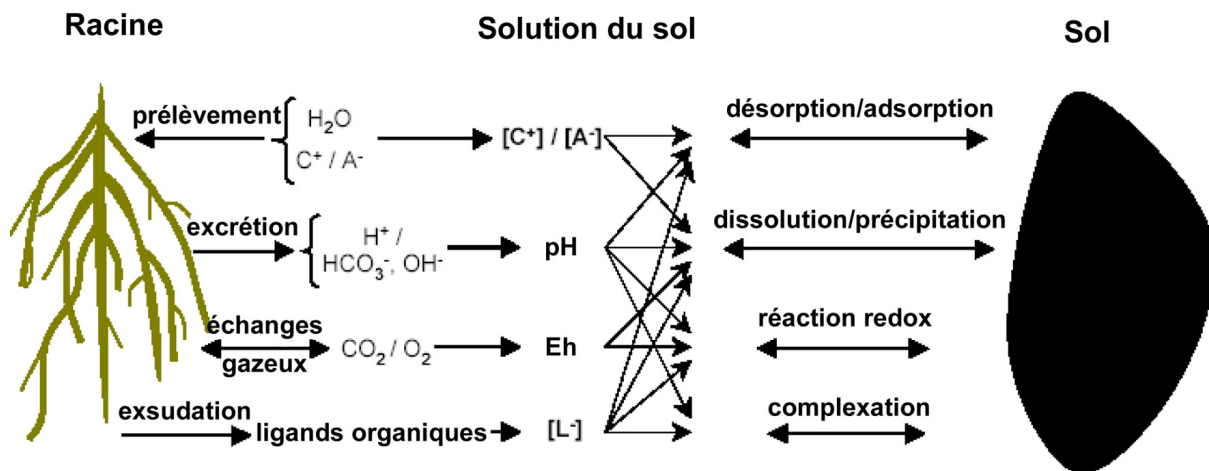


Figure I.2. Interactions sol-plante dans la rhizosphère (d'après Hinsinger, 2001).

I.2.1.1. Changement des concentrations ioniques

Les plantes prélèvent de l'eau et des éléments en solution, ce qui entraîne une augmentation ou une diminution des concentrations ioniques de la solution du sol dans la rhizosphère (Hinsinger, 1998a). Les éléments présents en solution du sol sont transférés à l'interface sol-racine par la diffusion et le flux de masse (Lorenz et al., 1994; Mc Laughlin et al., 1998).

Le flux des ions présents en grandes quantités dans la solution du sol, comme le calcium ou le magnésium, est souvent supérieur à la demande. Ces ions peuvent alors s'accumuler dans la rhizosphère et entraîner dans les sols calcaires la formation des précipités de carbonates de calcium, autour des racines (Jaillard, 1985; Hinsinger, 1998a). A l'inverse, les éléments présents en faibles quantités dans la solution du sol, comme c'est typiquement le cas des éléments traces, sont transférés en quantité comparable au prélèvement de la plante (Hinsinger, 1998a). Ceci entraîne une diminution de la concentration en métaux tels que Zn et Cu dans la rhizosphère. Cette diminution engendre un gradient de concentration à l'interface sol-racine et un transfert diffusif de ces éléments vers les racines.

Par le prélèvement racinaire, les plantes modifient les équilibres chimiques dans le sol au voisinage des racines. En effet, le rapport éléments traces/majeurs varie car la fraction d'un élément prélevé par la plante par rapport au stock initial est très supérieure pour les éléments traces. Les métaux initialement adsorbés sur les phases solides du sol peuvent ainsi passer en solution (désorption) pour établir un nouvel équilibre sol/solution du sol (Hinsinger, 1998a).

1.2.1.2. Changement du pH

Le prélèvement des nutriments par les racines peut également modifier le pH du sol dans la rhizosphère, du fait de l'activité d'échange racinaire. En effet, pour maintenir leur neutralité électrique, les racines végétales compensent leur absorption ionique par une excrétion de charges. Quand elles prélèvent davantage de cations que d'anions, les racines compensent le déficit de charge en excréant un excès de charges positives sous forme de protons, ce qui entraîne une acidification du milieu. Dans le cas contraire, quand la plante prélève davantage d'anions que de cations, les racines relâchent des ions hydroxyles ou bicarbonates (Hinsinger, 2001). Par exemple, la nutrition en azote se traduit soit par le prélèvement d'anion nitrate (NO_3^-), soit de cation ammonium (NH_4^+) ou, dans le cas des légumineuses en association avec des bactéries fixatrices, d'azote moléculaire (N_2). De nombreuses études montrent que les plantes qui prélèvent de l'ammonium ou de l'azote moléculaire acidifient la rhizosphère, alors que celles qui prélèvent de l'azote sous forme de nitrate tendent à l'alcaliniser.

Des acides organiques peuvent également être excrétés dans la rhizosphère par les racines. Cependant, ces acides organiques, dissociés au pH du cytoplasme sous forme anionique, contribuent très peu (moins de 0.3 %) à l'acidification de la rhizosphère (Hinsinger, 1998b).

Par ailleurs, la respiration racinaire augmente la pression partielle de CO_2 dans la rhizosphère, contribuant une fois encore à son acidification (Hinsinger, 1998b). La contribution de ce dernier phénomène à l'acidification rhizosphérique est particulièrement importante dans les sols calcaires du fait de la dissociation de l'acide carbonique.

Ainsi, en modifiant le pH de la rhizosphère, les plantes peuvent très diversement affecter la spéciation et la biodisponibilité des éléments traces, dont Zn et Cu, en raison, par exemple, de la dissolution de certains minéraux comme les carbonates, oxydes, phosphates, silicates et libérer ainsi les éléments traces contenus dans ces minéraux.

1.2.1.3. Changement des conditions redox

Les systèmes enzymatiques de type réductase au niveau des membranes des cellules racinaires contribuent à l'environnement réducteur dans le voisinage immédiat de la surface des racines (Marschner, 1995). La consommation d'oxygène par les racines et par les micro-organismes du sol contribue également à la baisse du potentiel redox. Ces changements des conditions redox favorisent la dissolution des oxydes de Fe et de Mn vu que les ions ferreux et manganeux sont plus solubles que les ions ferriques et manganiques. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée à présent sur l'influence des

changements de potentiel redox dans la rhizosphère sur la spéciation et la biodisponibilité du zinc et du cuivre.

1.2.1.4. Complexation des métaux avec des exsudats racinaires

Les racines végétales et les microorganismes rhizosphériques libèrent des exsudats organiques de masse moléculaire élevée ou faible (Marschner, 1995). Les exsudats racinaires varient selon la nature des espèces végétales et des microorganismes, et les conditions de croissance de la plante (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

Les principales macromolécules exsudées par les racines sont le mucilage (substance gélatineuse formée de polysaccharides), les ectoenzymes et les protéines. Ces composés ont diverses fonctions biologiques dont l'amélioration des contacts sol-racine, la protection des zones apicales des racines, ainsi que le prélèvement des nutriments (Marschner, 1995).

Les polysaccharides, les acides organiques, les phénols et les acides aminés représentent l'essentiel des exsudats de faible masse moléculaire (Marschner, 1995). Ils ont la capacité de former les complexes solubles avec les métaux tels que Fe, Mn, Cu, Zn et Pb, accroissant ainsi leur mobilité dans la rhizosphère (Mench et al., 1988; Marschner, 1995). Parmi les ligands organiques simples, le citrate, l'oxalate et le malate présentent de fortes affinités pour les métaux tels que Cu, Zn et Pb (Mench et al., 1988; Hinsinger et al., 2001). Ces ligands augmentent également la solubilité de nombreux minéraux en complexant l'élément constitutif du minéral (Jones, 1998). Le citrate et le malate peuvent dissoudre facilement les oxyhydroxydes de Fe, en particulier, la ferrihydrite et la goethite. L'oxalate ayant une forte affinité pour le Ca, il est susceptible de dissoudre certaines phases minérales riches en calcium, comme par exemple l'apatite.

L'excrétion des acides organiques par les plantes est stimulée en réponse à une déficience nutritionnelle en Fe. Ce comportement commun à toutes les familles végétales, excepté les graminées, représente une stratégie pour l'acquisition du Fe (Marschner, 1995). Parallèlement, les graminées, dans le cas de carence en Fe, adoptent une stratégie particulière en sécrétant des phytosidérophores (acides aminés, en particulier, acide mugénique et avénique) qui possèdent de fortes propriétés de complexation vis-à-vis de Fe et de Mn, mais aussi de Zn et de Cu (Marschner, 1995). Le transport de Fe complexé est ensuite réalisé *via* un système spécifique présent dans la membrane plasmique des cellules racinaires (Marschner and Römheld, 1994). Les implications des phytosidérophores dans les mécanismes de prélèvement des éléments traces, comme le Zn et le Cu, restent sujets à discussion en raison d'une faible affinité des transporteurs de la membrane plasmique pour les complexes phytosidérophore-Zn/Cu (Mench and Fargues, 1994a).

I.2.2. Mécanismes de prélèvement et d'accumulation des métaux dans la plante

Les mécanismes de prélèvement et d'accumulation des éléments métalliques dans les plantes peuvent intervenir à différents niveaux depuis l'absorption par les racines jusqu'à l'accumulation dans les feuilles.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes de la résistance des plantes vis-à-vis des éléments métalliques. Elles peuvent être classées en deux types, les mécanismes externes et les mécanismes internes. Cette classification repose sur l'idée que la tolérance et l'absorption des métaux sont fonctionnellement liées (Baker and Walker, 1990).

Les mécanismes externes consistent à limiter le passage du métal dans les racines par complexation du métal à l'extérieur des racines avec les composés organiques extracellulaires. Les mécanismes internes regroupent deux comportements définis comme la *stratégie d'exclusion* et la *stratégie d'accumulation* (Baker and Walker, 1990). La stratégie d'exclusion, adoptée par les espèces *tolérantes*, consiste à réduire l'absorption des métaux par les racines et leur transfert vers les parties aériennes, en les immobilisant à l'extérieur ou à l'intérieur des racines, dans ce cas le métabolisme de la plante n'est pas modifié. La stratégie d'accumulation consiste à transférer des métaux absorbés vers les organes aériens. Ainsi, le rapport entre la teneur en métaux dans les organes aériens et celle dans les racines, donne-t-il une indication sur le mécanisme physiologique adopté par l'espèce végétale. Certaines plantes sont *hyperaccumulatrices* et peuvent contenir plus de 1 g/kg d'un élément trace des parties aériennes (Baker and Brooks, 1989). Ces plantes développent une réponse physiologique spécifique qui permet l'hyperaccumulation et la prévention de la toxicité des métaux.

I.2.2.1. Absorption par les racines

Les plantes prélèvent des espèces solvatées. Il est nécessaire que l'élément passe en solution pour être absorbé par la racine. Actuellement, on estime que pour la majorité des métaux et métalloïdes, le prélèvement se fait sous des formes ioniques : cationiques (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) ou anioniques (HAsO_4^{2-}) (Lasat et al., 1998). Dans des cas particuliers, des complexes inorganiques et/ou organiques semblent jouer un rôle dans le prélèvement des métaux. Par exemple, une augmentation du prélèvement de Cd est observée en présence de chlorures, suggérant que soit les complexes CdCl^+ et CdCl_2 sont directement absorbés, soit ils pourraient participer à la diffusion vers les racines (Smolders et al., 1998). Pour certains métaux tels que Fe, Zn, Cu et Pb, des formes complexées par des ligands

organiques semblent intervenir dans le prélèvement. Par exemple, des complexes Pb-EDTA ont été identifiés dans les plantes, suggérant que ces complexes soient directement absorbés ou participent à l'absorption (Blaylock et al., 1997; Vassil et al., 1998; Epstein et al., 1999; Wu et al., 1999; Sarret et al., 2001).

Les éléments métalliques sont-ils absorbés tout le long de la racine ou préférentiellement par certaines zones ? Les poils racinaires, formés par les cellules épidermiques, ont été longtemps considérés comme les principaux sites de l'absorption racinaire, du fait qu'ils augmentent considérablement la surface d'échange avec le milieu. Plus récemment, les expériences isotopiques et les mesures de l'absorption ionique chez plusieurs espèces végétales ont démontré qu'il existe une zone d'absorption plus rapide, de quelques centimètres de long, à l'extrémité des racines, mais que toutes les zones de la racine sont susceptibles d'absorber des ions.

La racine végétale est organisée en deux ensembles concentriques : le cortex à l'extérieur et la stèle à l'intérieur. La stèle est séparée du cortex par une barrière apoplasmique (bande Caspari) située sur la couche cellulaire la plus interne de celui-ci, l'endoderme. Les nutriments passent du cortex à la stèle à travers les plasmodesmes, particulièrement nombreux dans l'endoderme (Figure I.3). Cependant, la barrière apoplasmique est interrompue par endroits, en particulier à l'extrémité des racines, là où l'endoderme n'est pas encore fermé, et aux sites d'émergence des racines latérales où une brèche s'ouvre dans l'endoderme.

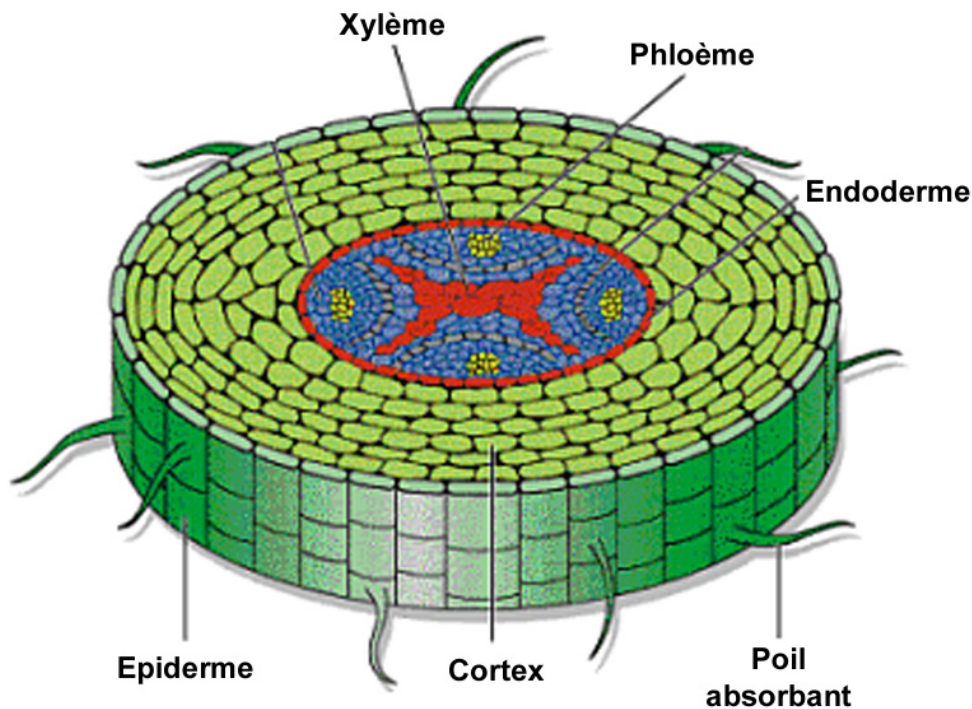


Figure I.3. Coupe de la racine végétale.

1.2.2.2. Transfert radial vers le xylème

Le transfert radial des ions métalliques de la surface des racines jusqu'aux vaisseaux du xylème peut suivre deux voies : la *voie apoplasmique* (en bleu), ou la *voie symplasmique* (en rouge) en traversant la membrane plasmique d'une cellule, généralement de la couche la plus externe du cortex, puis en passant de cellule à cellule par les plasmodesmes (les pores de la paroi cellulaire). Dans le dernier cas, les ions sont transportés à travers les membranes plasmiques des cellules par des protéines transporteuses, ou bien par complexation ou échange cationique avec les groupements fonctionnels (carboxyles, hydroxyles, phosphoryles, amines, etc.) de la paroi. Dans l'endoderme, les parois cellulaires, imprégnées par des substances hydrophobes, forment la bande de Caspari, barrière apoplasmique qui s'oppose aux mouvements des ions métalliques dans le sens radial : ceux-ci quittent la voie apoplasmique et sont absorbés par les cellules de l'endoderme pour pénétrer dans la stèle, où se trouvent les vaisseaux du xylème (Figure I.4).

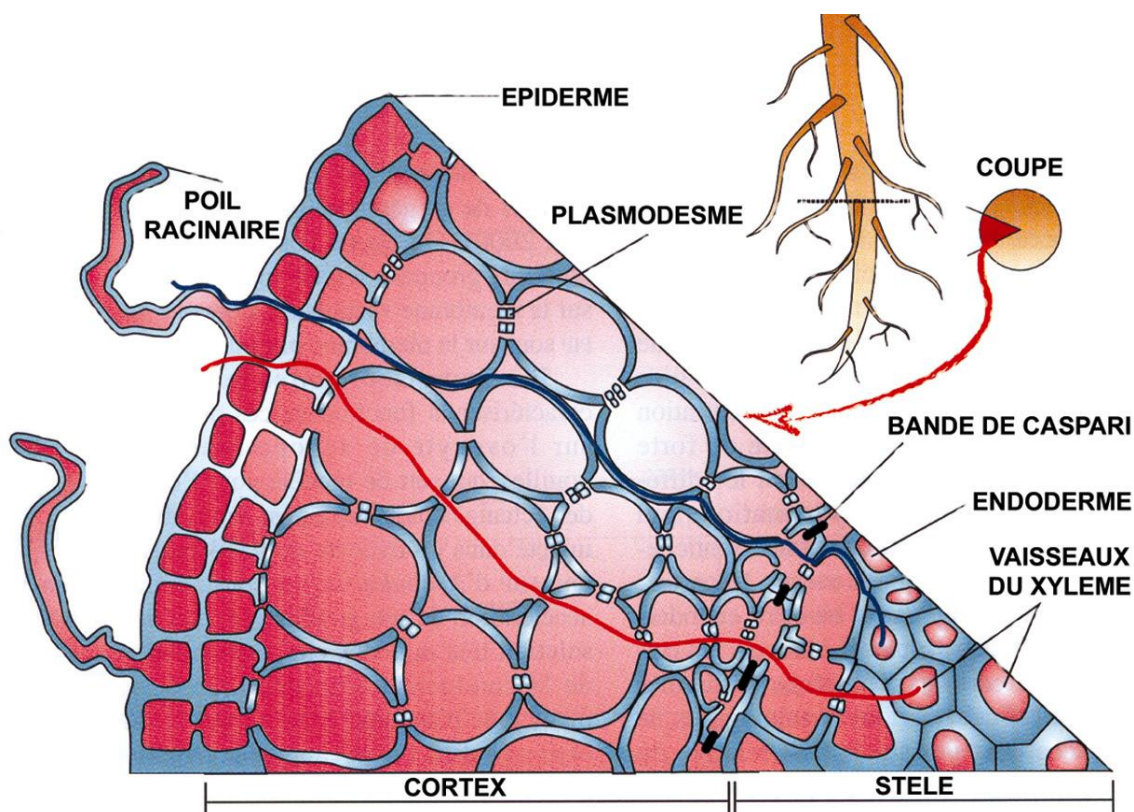


Figure I.4. Trajet des éléments métalliques de la surface des racines jusqu'au xylème.

La majorité des ions métalliques dans la racine, à l'exception des ions calcium (transportés essentiellement dans l'apoplasme), empruntent un transport transmembranaire.

On distingue deux types de systèmes de transport ionique sur la membrane plasmique : l'ATPase-pompe à protons (i), et les canaux et les transporteurs (ii) :

- (i) L'énergie chimique libérée par l'hydrolyse de l'adénosinetriphosphate (ATP) sert à excréter des protons à l'extérieur de la cellule (du cytoplasme vers la paroi), établissant ainsi des gradients de pH (plus acide à l'extérieur) et de potentiel électrique (face négative à l'intérieur) à travers la membrane ;
- (ii) Les canaux laissent passer sélectivement les ions métalliques par diffusion, le long de leur gradient de potentiel électrochimique. Le passage des ions à travers les canaux est très rapide : 10^6 à 10^7 ions par seconde et par canal. Le transport *via* les protéines transporteuses est environ 1000 fois moins rapide, il peut être dans le sens du gradient électrochimique (par le biais d'un uniporteur) ou contre le gradient électrochimique (par un cotransporteur).

En fonction des mécanismes mis en jeu, les éléments métalliques sont soit immobilisés (séquestrés) dans les tissus racinaires, notamment dans les plantes présentant une stratégie d'exclusion, soit transférés vers les organes aériens, dans les plantes accumulatrices.

Lasat et al. (1998) ont mesuré des quantités de Zn similaires dans l'apoplasme et le cytoplasme du non-accumulateur *Thlaspi arvense* et de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens*. Néanmoins, les quantités de Zn mesurées dans les vacuoles des cellules racinaires sont nettement supérieures chez le non-accumulateur. Cela est expliqué par une plus grande séquestration de Zn dans les vacuoles racinaires du non-accumulateur. Salt et al. (1999) ont démontré que dans la racine de *Thlaspi caerulescens*, la majorité de Zn intracellulaire est associée à l'histidine. Il serait donc transporté vers le xylème sous cette forme.

1.2.2.3. Transport dans les organes aériens

L'absorption des éléments nutritifs par les racines est régulée grâce à la circulation de signaux internes entre les organes de la plante. En effet, les nutriments absorbés par les racines sont transportés vers les organes aériens dans le xylème par la sève brute (ou sève vasculaire). Parallèlement, les feuilles émettent, par le biais du métabolisme foliaire, des « signaux régulateurs » qui sont envoyés vers les racines dans le phloème par la sève élaborée (ou sève libérienne), qui fournit l'information de demande nutritionnelle aux systèmes de transport racinaire.

Une fois arrivés dans les feuilles avec la sève, les éléments métalliques, alors en contact avec les parois des cellules foliaires, sont le plus souvent absorbés et stockés, voire partiellement évaporés dans l'atmosphère par transpiration dans le cas des éléments volatils, comme le sélénium ou le mercure.

Lors du passage dans la sève du xylème, un élément métallique peut changer, une nouvelle fois, sa spéciation. Ainsi, Salt et al. (1999) ont montré, dans le cas de *Thlaspi caerulescens*, que le Zn (étant dans les racines sous forme du complexe Zn-histidine) est transporté vers les parties aériennes essentiellement sous forme cationique libre Zn^{2+} avec une faible proportion liée aux acides organiques (principalement au citrate). Zn est finalement stocké dans les vacuoles des cellules foliaires sous forme de complexe avec le citrate. La complexation du Zn par les acides organiques de faible poids moléculaire dans les feuilles semble être un moyen de détoxification interne chez les plantes hyperaccumulatrices (Mathys, 1977).

I.2.3. Interactions au niveau de l'écosystème sol - plante

Outre les mécanismes opérant au niveau de la plante, de très nombreux facteurs externes et internes peuvent intervenir au niveau de l'écosystème sol-plante. En effet, le sol et la plante forment un *écosystème*, c'est-à-dire un système limité dans l'espace constitué par l'ensemble des communautés d'êtres vivants qui s'y trouvent et par l'ensemble des conditions énergétiques, physiques, chimiques et biologiques qui règnent au voisinage immédiat de ces êtres vivants (Dommergues and Mangenot, 1970). Dans cet écosystème deux facteurs sont susceptibles, entre autres, d'influencer considérablement la spéciation des éléments métalliques.

Le facteur écologique. Les conditions du milieu comme le climat, la pluviométrie, le vent, l'alternance des cycles hydromorphie/assèchement, la présence de cations compétiteurs des métaux lourds (Ca, K, etc.) peuvent modifier les interactions dans le système sol-plante.

Le facteur biotique. Les interactions microbiotiques se manifestent entre les communautés microbiennes et le sol, ainsi qu'entre les communautés microbiennes et la plante. Les microorganismes y jouent deux rôles essentiels : d'une part, ils sont responsables de transformations chimiques et même physiques dans le sol, et d'autre part, ils agissent directement ou indirectement sur la nutrition de la plante.

Au niveau des interactions microorganismes-sol, les transformations microbiennes susceptibles d'influencer le devenir des éléments métalliques peuvent se classer en quatre catégories : (i) minéralisation de la matière organique ; (ii) immobilisation des composés inorganiques par la microflore ; (iii) oxydation ; (iv) réduction. Il faut y rajouter des processus encore mal connus, comme la solubilisation des minéraux par les complexes d'origine microbienne, la précipitation par voie microbienne des minéraux solubilisés, l'accumulation sur les surfaces microbiennes de certains éléments (Mn, Fe, P, etc.).

L'influence des microorganismes sur la plante comporte, entre autres, les actions suivantes : (i) apport azoté résultant de la fixation d'azote par des bactéries rhizosphériques (comme *Rhizobium*, *Frankia*, *Azospirillum*, etc.); (ii) synthèse de phytohormones (auxines, gibbérellines, cytokinines, etc.); (iii) solubilisation des nutriments par l'intermédiaire d'agents chélatants; (iv) antagonisme vis-à-vis des agents pathogènes.

I.3. La phytoremédiation

La phytoremédiation est une technique de réhabilitation environnementale qui utilise les capacités des plantes pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les polluants. L'idée d'utiliser les plantes pour la réhabilitation environnementale est ancienne, puisqu'il y a 300 ans les hommes utilisaient déjà les plantes pour le traitement de l'eau. Cependant, ce n'est que récemment que l'utilisation des plantes pour la réhabilitation des sols a pris son essor (Baker and Brooks, 1989; Salt et al., 1995).

La plante est en effet un système biologique de pompage et de filtration, actionné par le soleil, qui a des capacités inhérentes de chargement, dégradation et engorgement. Les racines peuvent trouver, altérer et « transloquer » ou déplacer des éléments et des composés contre des gradients chimiques importants. Les surfaces des racines supportent des bio-films bactériens actifs et des extensions fongiques qui augmentent significativement la surface de contact avec le sol et les capacités métaboliques de la plante. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé des mécanismes pour s'adapter et se multiplier dans des conditions hostiles. Certaines plantes ont adopté des mécanismes racinaires qui permettent d'immobiliser les métaux au niveau des racines et de diminuer leur transfert vers les feuilles où les métaux seraient toxiques. D'autres plantes ont développé des mécanismes complexes pour tolérer, absorber et accumuler dans leurs tissus des quantités significatives de métaux.

I.3.1. Les concepts et les avantages

La phytoremédiation est définie par Cunningham and Berti (1993) comme l'utilisation de végétaux supérieurs pour extraire, stabiliser ou dégrader des substances polluantes. Cette technique peut être appliquée à des métaux lourds, à des radioéléments ou à des polluants organiques présents dans le sol ou dans l'eau (Dushenkov et al., 1995; Salt et al., 1995; Raskin et al., 1997; Dushenkov, 2003; Krämer, 2005).

L'étymologie du mot phytoremédiation provient du grec « phyton » - plante, et du latin « remedium » - rétablissement de l'équilibre, remédiation. On distingue souvent les notions de *phytoremédiation* et de *phytorestauration*. Le terme remédiation suppose l'action de remédier, en mettant l'accent sur le processus. Le terme restauration suppose le rétablissement d'un système dans son état normal. La restauration écologique implique la restauration des ressources vers un état proche de l'origine, en termes de structure et de fonction (Bradshaw, 1996). La restauration écologique met en lumière la question du niveau de restauration nécessaire et suffisant pour que la ressource puisse retrouver sa fonction d'usage. Il existe en effet une différence entre restaurer un sol pour atteindre un niveau satisfaisant de décontamination pour que le sol soit à nouveau exploitable, et restaurer totalement un site pour qu'il revienne à des conditions antérieures à la contamination. Le sol étant un système dynamique, le retour à son état initial est quasi impossible. Lorsque l'on fait référence à la *phytorestauration* d'un sol, on parle alors d'un procédé qui vise à réduire, grâce à l'action des plantes, la pollution du sol jusqu'à un niveau nécessaire et suffisant pour que le sol puisse retrouver sa fonction d'usage. Utilisée dans ce sens, la phytorestauration devient synonyme du terme phytodécontamination. C'est pourquoi la phytorestauration est souvent considérée comme une subdivision de la phytoremédiation.

Le terme générique de phytoremédiation regroupe deux stratégies de remédiation : (i) **la phytostabilisation** qui vise à **réduire la mobilité des contaminants**, en particulier des métaux, dans des sols ou des sédiments contaminés ; (ii) **la phytodécontamination** qui vise à **réduire la teneur des contaminants** présents dans le milieu.

La phytostabilisation utilise le couvert végétal pour diminuer la mobilité et la biodisponibilité des métaux présents dans le substrat et, dans l'idéal, immobiliser les métaux *in situ*. Les plantes utilisées en phytostabilisation sont des espèces métallotolérantes adoptant une stratégie d'exclusion (Berti and Cunningham, 2000). Les métaux sont piégés au niveau de la racine, diminuant les risques de lessivage vers les eaux souterraines ou encore l'entraînement par érosion éolienne ou hydraulique. Cette technique est souvent complétée par l'ajout d'amendements organiques ou minéraux. Par exemple, les scories

phosphatées (Mench et al., 1994b; Panfili et al., 2005), la béringite (Vangronsveld et al., 1995), la grenaille d'acier (Boisson et al., 1999), et le compost municipal (Mench et al., 2003) ont été utilisées pour immobiliser Zn, Cu, Pb, Cd, Ni et As dans des sols, des sédiments et des friches industrielles. La phytostabilisation est bien adaptée pour réhabiliter des vastes zones contaminées et mises à nu par la trop forte phytotoxicité du substrat. Néanmoins, cette technique ne permet pas de décontaminer le substrat, et le risque sur le long terme serait une remobilisation des polluants et leur propagation dans l'environnement, suite à des modifications des conditions physico-chimiques du milieu.

La phytodécontamination regroupe plusieurs techniques selon le type d'action des plantes, la nature du milieu contaminé et la nature des contaminants.

La phytoextraction utilise les capacités accumulatrices des plantes pour extraire les métaux des sols et des sédiments. Cette technique de décontamination est basée sur la culture des plantes possédant des propriétés de tolérance vis-à-vis de métaux et des propriétés d'accumulation et de concentration des métaux dans leurs parties aériennes. Les parties aériennes peuvent ensuite être récoltées, puis les métaux sont concentrés par des traitements thermiques, chimiques ou microbiologiques. Les métaux peuvent aussi être récupérés et réutilisés à but économique (**le phytomining**) (Robinson et al., 1997).

Certaines plantes sont naturellement capables d'accumuler de fortes teneurs en métaux : ce sont des plantes *accumulatrices*, les teneurs accumulées dans leurs tissus sont supérieures à celles présentes dans le sol. Certaines sont dites *hyperaccumulatrices*, si elles sont capables d'accumuler plus de 10000 mg·kg⁻¹ de Mn, Ni ou Zn, plus de 1000 mg·kg⁻¹ de Cu, Co, Pb, Cr, ou plus de 50 mg·kg⁻¹ de Cd dans leurs feuilles (Baker and Brooks, 1989; Brooks, 1998). L'hyperaccumulation concerne un large éventail de métaux, et il existe environ 440 espèces reconnues de plantes hyperaccumulatrices (e.g. *Alyssum bertolonii*, *Alyssum murale*, *Berkheya coddii*, *Sebertia acuminata*, *Silene cobalticola*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica napus*, *Pteris vittata*), dont plus de 300 sont les hyperaccumulatrices de Ni. Un nombre réduit seulement de ces plantes est présent en climat tempéré, notamment en Europe. En France, des sites métallifères (gisements, anciennes mines ou fonderies) abritent une flore hyperaccumulatrice, et en particulier, *Thlaspi caerulescens* ou tabouret calaminaire (Schwartz, 1997; Reeves et al., 2001). *Thlaspi caerulescens* est surtout connu pour sa propriété à accumuler le zinc (> 1 % MS), mais certaines populations possèdent aussi l'aptitude à concentrer Cd, Pb et Ni (> 0.3 % MS) (Schwartz et al., 2003; Schmitt-Sirguey, 2004; Schwartz et al., 2006). Une récolte réalisée à partir d'une pelouse métallophyte naturelle permet d'atteindre une extraction de 10 kg de Zn par ha (Schwartz et al., 2001). Cette plante possède aussi une remarquable aptitude à développer ses racines

préférentiellement dans les zones du sol où les métaux sont présents en forte concentration (Schwartz et al., 1999). La relative faible vitesse de croissance et la taille de *Thlaspi caerulescens* tendent à limiter le rendement de l'extraction, mais cette plante répond positivement à la fertilisation azotée et soufrée par une augmentation de la production de biomasse (Schwartz et al., 2003).

La plante idéale pour la phytoextraction doit être capable d'absorber de fortes teneurs en métaux et de les accumuler dans les parties récoltables, tout en ayant une croissance rapide et une forte biomasse (Blaylock and Huang, 2000). La plupart des plantes hyperaccumulatrices sont de petites tailles et ont une croissance lente, produisant ainsi une faible biomasse. D'autres plantes sont seulement tolérantes et ne peuvent accumuler que des teneurs relativement faibles en métaux dans leurs tissus, mais produisent une biomasse plus importante. Depuis près de quinze ans, deux principales approches de la phytoextraction se développent parallèlement : la phytoextraction par des plantes hyperaccumulatrices (Raskin et al., 1997; Robinson et al., 1997; Lasat et al., 1998; Robinson et al., 1998; Salt et al., 1999; Lombi et al., 2001; Schwartz et al., 2001; Keeling et al., 2003; Schwartz et al., 2003) et la phytoextraction par des plantes tolérantes à forte biomasse (e.g. *Brassica spp.*, *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Populus spp.*, *Salix spp.*). Cette dernière technique de phytoextraction est souvent assistée par l'ajout de réactifs chélatants afin d'augmenter la solubilité des métaux dans les sols (Blaylock et al., 1997; Ebbs et al., 1997; Huang et al., 1997; Anderson et al., 1998; Vassil et al., 1998; Cooper et al., 1999; Epstein et al., 1999; Robinson et al., 1999; Wu et al., 1999; Blaylock and Huang, 2000; Kayser et al., 2000; Robinson et al., 2000; Chen and Cutright, 2001; Grcman et al., 2001; Römkens et al., 2002; Chen et al., 2003; Kos and Lestan, 2003; Thayalakumaran et al., 2003a; Thayalakumaran et al., 2003b; Thayalakumaran et al., 2003c; Wenzel et al., 2003; Turgut et al., 2004; Wu et al., 2004; Luo et al., 2006; Evangelou et al., 2007; Komárek et al., 2007; Komárek et al., 2008). L'ajout des chélatants (comme EDTA, DTPA, etc.) permet de solubiliser les métaux dans le sol et de favoriser, dans certains cas, leur transfert vers les racines sous formes de complexes en solution (Blaylock et al., 1997; Huang et al., 1997). D'autres recherches en phytoextraction visent à accroître la quantité de métal extrait à chaque cycle biologique en transférant les gènes responsables de l'hyperaccumulation chez les plantes tolérantes à forte biomasse (Raskin, 1996).

La rhizofiltration, appelée également **la phytofiltration** ou encore **la phytoépuration**, utilise des racines des plantes pour dégrader et/ou éliminer les polluants des effluents (eaux de surface, eaux souterraines extraites, eaux usées, boues liquides). Les systèmes racinaires favorisent la dégradation et la minéralisation de composés organiques, ils absorbent, précipitent et concentrent les métaux (Raskin et al., 1994b). Cela

sous-entend l'utilisation des plantes dont les racines ont une croissance rapide et une forte biomasse pour obtenir la plus grande surface de contact avec la matrice polluée. Les plantes « terrestres » telles que la moutarde indienne (*Brassica juncea*) (Dushenkov et al., 1995), le peuplier (*Populus* spp.) (Moffat et al., 2001), ou les plantes de zones humides telles que les roseaux (*Phragmites* spp.), les massettes (*Typha* spp.), les scirpes (*Scirpus* spp.), les saules (*Salix* spp.), les iris (*Iris* spp.), etc., sont utilisées pour le traitement des effluents par rhizofiltration (Weis and Weis, 2004). Cette technique d'épuration est inspirée principalement des phénomènes naturels d'assainissement (autoépuration) observés dans des zones humides (lacs, marais, prairies humides, etc.). Elle est ainsi la base de traitement des effluents dans des zones humides artificielles (anglais : constructed wetlands) (Hammer, 1989; Horne, 2000). Les mécanismes impliqués dans le traitement des polluants varient selon le type de polluants et le type de plantes : processus biologiques ou adsorption de surface, processus physiques et chimiques tels que la chélation, les échanges d'ions et l'adsorption spécifique (ne requérant pas d'activité biologique, elle peut se faire sur des tissus morts) (Dushenkov et al., 1995). En France, depuis des années 1980, des recherches du Cemagref dans le domaine des cultures fixées sur supports fins plantés de roseaux ont conduit à la filière « Filtres Plantés de Roseaux » dans le domaine du traitement des eaux usées des collectivités (Molle et al., 2004). Ces systèmes d'épuration de différentes configurations sont basés sur l'utilisation des systèmes racinaires des macrophytes tels que par exemple *Phragmites australis* implantés dans un filtre contenant un substrat poreux (pouzzolane, gravier, sable, etc.). L'efficacité de ces systèmes est reconnue pour le traitement des virus et des bactéries pathogènes, des demandes biochimiques en oxygène (DBO₅) et des solides en suspension. Le traitement de l'azote et de l'ammoniac par nitrification varie suivant le système, et le traitement du phosphore et des métaux lourds est plus limité (Liénard et al., 2004).

La phytovolatilisation utilise les plantes afin de transformer certains éléments volatils du sol (As, B, Hg, Se) sous forme gazeuse (ex., le diméthylsélénide) et de les éliminer dans l'atmosphère par évapotranspiration (Terry et al., 1992).

La phytodégradation utilise les plantes et les microorganismes associés pour transformer au niveau de la rhizosphère les polluants organiques toxiques en substances moins toxiques. Cette technique se rapproche plus de la bioremédiation assistée par les plantes puisqu'elle repose sur l'action des microorganismes rhizosphériques.

Par rapport aux techniques conventionnelles physico-chimiques de traitement des matrices polluées (stabilisation, lavage, mise en décharge, confinement, incinération, etc.), la

phytoremédiation présente de nombreux avantages d'ordre environnemental et économique. Les techniques de phytoremédiation sont applicables à un grand nombre de polluants, elles ne provoquent qu'un minimum de perturbations dans l'environnement, enfin leur coût est faible (Raskin et al., 1994b). Salt et al. (1995) estiment le coût de la phytoremédiation des sols entre 60 000 et 100 000 US \$ par hectare, soit environ la moitié du coût des procédés conventionnels les moins onéreux. Les techniques de phytoremédiation apparaissent alors comme des méthodes alternatives ou des méthodes complémentaires aux méthodes conventionnelles, moins coûteuses, plus extensives et plus respectueuses de l'environnement.

I.3.2. Les limites

Bien que les techniques de phytoremédiation soient déjà assez largement employées outre-Atlantique, de nombreuses inconnues persistent, en particulier sur les formes de séquestration des métaux par les plantes, sur les mécanismes physiologiques de résistance et d'accumulation, ainsi que sur l'évolution à long terme des sites réhabilités *in situ*. Par ailleurs, l'application de la phytoremédiation *in situ* dans des conditions naturelles rencontre plusieurs limites.

Le principal obstacle à l'affirmation de la phytoremédiation, et plus particulièrement de la phytoextraction, comme technologie de dépollution à part entière, est la durée de traitement. En effet, la dépollution par les plantes est conditionnée avant tout par les cycles de croissance végétale. Or, sous nos climats les plantes ont généralement un seul cycle végétal par an et les plantes hyperaccumulatrices ont à la fois une croissance lente et une faible biomasse. Par conséquent, un temps de traitement assez long, de nombreuses années, serait alors nécessaire pour réduire les teneurs en métaux d'un site jusqu'à un niveau acceptable. Salt et al. (1995) estiment que l'utilisation des plantes hyperaccumulatrices naturelles nécessiterait 13-16 ans pour dépolluer un site. Toutefois, il faut noter que la gamme de variation de la durée effective nécessaire pour dépolluer un sol par phytoextraction est plus large et fortement contexte-dépendante. Les temps de traitement dépendent des caractéristiques du sol, de la nature des métaux considérés, du niveau de la pollution, ainsi que des espèces végétales utilisées. Ceux-ci peuvent varier de quelques années à quelques dizaines d'années selon le cas (Blaylock and Huang, 2000).

Une autre limite de la phytoextraction réside dans le fait que l'accumulation d'un métal par la plante peut être inhibée lorsque le sol contient une pollution polymétallique. Par exemple, *Berkheya coddii*, une plante hyperaccumulatrice du nickel, accumule cinq fois moins de Ni lorsque le milieu de culture contient à la fois Ni et Co (Keeling et al., 2003).

En outre, la dépollution par des plantes, comme toute autre méthode biologique, ne permet pas d'éliminer ou réduire la pollution à 100 %, puisque, d'une part, seule la fraction biodisponible des métaux peut être prélevée par les plantes, et d'autre part, la capacité des plantes à accumuler les métaux décroît lorsque la concentration des métaux dans leurs tissus augmente. Ainsi, les plantes ne peuvent extraire qu'une quantité limitée de polluants. Cette technique n'est adaptée donc qu'à des sites faiblement ou moyennement pollués.

Enfin, l'action de la plante est généralement limitée au sol de surface, voire au sol rhizosphérique, et dépend fortement de la biodisponibilité des polluants dans cette zone. Ainsi, les paramètres intrinsèques de l'espèce végétale, comme la surface de contact avec la matrice pédologique, la biomasse, la nature et la quantité des exsudats racinaires jouent un rôle essentiel dans l'efficacité du traitement (Walton and Anderson, 1992).

I.3.3. Les stratégies pour accroître la phytodécontamination

L'efficacité de la dépollution dans le système sol-plante dépend, d'une part, de la productivité de la plante en termes d'accumulation des métaux et de production de la biomasse, et d'autre part, de la solubilité des métaux dans le sol.

L'utilisation conventionnelle des plantes hyperaccumulatrices, qui ont une faible biomasse, ne permet généralement pas d'atteindre de forts rendements en extraction. Par ailleurs, les plantes hyperaccumulatrices n'ont souvent pour cible qu'un seul métal, elles ne sont donc pas adaptées au traitement de la pollution polymétallique.

Les stratégies actuelles en phytodécontamination consistent à utiliser des plantes métallotolérantes avec une biomasse importante et une capacité d'accumulation moyenne. L'objectif est alors d'accroître la mobilité des métaux dans le sol afin d'augmenter leur accumulation dans la plante.

Les interactions existantes dans le système sol-plante, en particulier au niveau de la rhizosphère, ont pour conséquence de modifier la spéciation et la mobilité des métaux en les rendant disponibles pour la plante. L'excrétion, au niveau des racines, des molécules organiques de faible poids moléculaire, telles que les acides acétique, oxalique, fumarique, citrique, etc., permet la formation des complexes solubles entre ces molécules et le métal. L'utilisation des réactifs complexants, ou chélatants, pour améliorer l'efficacité de la phytoextraction est basée sur ce constat (Chen et al., 2003). Les chélatants naturels (tels que les acides citrique, oxalique, etc.) ou les chélatants de synthèse (tels que EDTA, DTPA, NTA etc.), ayant une forte affinité pour les éléments métalliques, sont utilisés pour solubiliser des métaux dans le sol. En effet, les complexants entrent en compétition avec les constituants du sol auxquels les métaux sont associés. Une partie du stock de métaux passe

alors en solution sous forme de complexes métal-chélate stables et solubles (Norvell, 1984; Peters, 1999; Hauser et al., 2005).

De nombreuses études en phytoextraction de différents métaux, tels que Pb, Zn, Cu, Cd, Ni, Co, et Au, en présence des chélatants ont été effectuées (Blaylock et al., 1997; Ebbs et al., 1997; Huang et al., 1997; Anderson et al., 1998; Vassil et al., 1998; Cooper et al., 1999; Epstein et al., 1999; Robinson et al., 1999; Wu et al., 1999; Blaylock and Huang, 2000; Kayser et al., 2000; Robinson et al., 2000; Chen and Cutright, 2001; Grcman et al., 2001; Lombi et al., 2001; Römkens et al., 2002; Chen et al., 2003; Kos and Lestan, 2003; Thayalakumaran et al., 2003a; Thayalakumaran et al., 2003b; Thayalakumaran et al., 2003c; Wenzel et al., 2003; Turgut et al., 2004; Wu et al., 2004; Luo et al., 2006; Evangelou et al., 2007; Komárek et al., 2007; Komárek et al., 2008). Les résultats obtenus sont très variables, et dépendent du métal cible, du chélatant et de la plante utilisée (Tableau I.4). Certaines de ces études montrent de bons résultats. On obtient alors une extraction du métal du sol et une accumulation de ce métal dans les feuilles de la plante. Dans d'autres cas, l'accumulation du métal par la plante est présente, mais entraîne une perte de la biomasse ou des lésions chez la plante. En effet, l'accumulation de teneurs élevées en métaux induite par des chélatants provoque un stress de la plante et affecte sa productivité, surtout dans le cas d'une pollution polymétallique, lorsque plusieurs métaux avec différents degrés de phytotoxicité sont biodisponibles. Par exemple, Zn et surtout Cu sont plus toxiques que Pb pour la majorité des plantes. Ainsi, lorsque la plante accumule simultanément ces trois métaux, sa croissance est affectée lorsque le seuil le plus bas de la phytotoxicité, en l'occurrence celui de Cu, est atteint (Lombi et al., 2001).

De manière générale, les chélatants sont assez efficaces pour remobiliser des métaux dans le sol et induire leur accumulation dans les plantes. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus pour la phytoextraction de Pb par la moutarde indienne (*Brassica juncea*) en présence de l'EDTA. Blaylock et al. (1997) suggèrent que cette technique pourrait permettre d'extraire entre 180 et 530 kg de Pb par hectare et par an, rendant possible la dépollution en moins de 10 ans des sites contaminés par le plomb à la hauteur de 2500 mg/kg.

Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que l'application des chélatants dans le milieu naturel présente des risques. Du fait de leur fort pouvoir complexant, et de leur persistance dans l'environnement, due à leur faible biodégradabilité, les chélatants synthétiques (type EDTA) peuvent entraîner une migration massive des métaux dans l'environnement. Komárek et al. (2007) ont évalué les risques associés à la phytoextraction de Pb par le peuplier en présence d'EDTA. Ils ont montré que l'application de l'EDTA maintient les métaux, Pb et Cu, dans le sol sous des formes fortement mobiles pendant deux années suivant l'application. Ces métaux peuvent être lessivés vers les nappes ou alors être

absorbés par des plantes, puis des animaux, et atteindre ainsi la chaîne alimentaire. La migration des métaux à travers le sol a également des effets toxiques sur les microorganismes présents dans le sol (Grcman et al., 2001).

Par conséquent, l'utilisation des chélatants en phytoremédiation nécessite une approche adaptée et prudente. Leur dégradation et leur toxicité doivent être examinées au préalable. Leur usage dans le milieu naturel nécessite un dispositif pour contenir le lessivage du sol, afin d'éviter la pollution des nappes suite à la remobilisation des métaux et au déversement des complexants. Enfin, les chélatants peuvent affecter la croissance végétale. Pour ces raisons, l'utilisation des plantes à système racinaire extensif, comportant des tiges souterraines du type rhizome, semble être une voie intéressante bien que peu explorée.

D'autres stratégies en phytoextraction visent à accroître la quantité de métal extrait à chaque cycle biologique par le biais des transformations génétiques. En dépit du fait que l'extraction du métal par la plante nécessite l'absorption et le transfert du métal dans les parties récoltables, la plante idéale pour la phytoextraction doit combiner la capacité d'accumuler de fortes teneurs en métaux, comme *Thlaspi caerulescens*, et celle de produire rapidement une forte biomasse, comme *Brassica juncea*. Ainsi, se développe de plus en plus une approche génétique. Ces études portent sur l'introduction des gènes responsables de la production de protéines et de peptides permettant l'accumulation et la tolérance d'un métal donné dans des plantes ayant une croissance rapide et une biomasse importante (Mejare and Bulow, 2001).

Tableau I.4. Synthèse des principales études de phytoextraction assistée par des chélatants.

Chélatants	Métaux	Plantes	Observations	Références
EDTA, HEDTA, DTPA, EGTA, EDDHA	Pb	<i>Zea mays</i> (maïs), <i>Pisum sativum</i> (pois)	Efficacité : EDTA > HEDTA > DTPA > EGTA > EDDHA. Amélioration de la translocation vers les feuilles.	Huang et al., 1997
EDTA	Pb, Zn, Cd		Augmentation des teneurs en métal dans les feuilles.	Grcman et al., 2001
EDTA, EDDS	Pb	<i>Brassica rapa</i> (chou chinois)	Accumulation de Pb dans les feuilles, mais capacités insuffisantes pour une réelle application.	Kos et Lestan, 2003
EDTA	Pb	<i>Brassica juncea</i> (moutarde indienne)	Concentration de Pb dans les feuilles (1 %).	Blaylock et al., 1997
	Pb		Augmentation de la concentration de Pb dans les feuilles, cependant une diminution de la biomasse.	Epstein et al., 1999
	Cd, Cu, Pb, Zn		Faible accumulation des métaux.	Wu et al., 2004
EDTA, HEDTA	Cd, Cr, Ni	<i>Helianthus annuus</i> (tournesol)	Augmentation des concentrations dans les tissus (Ni et Cd dans les feuilles, Cr dans les racines), cependant diminution de la biomasse. EDTA est plus efficace.	Chen et Curtight, 2001
EDTA	Cd, Cr, Ni		Augmentation de l'absorption et du transport des racines aux feuilles. Diminution de la biomasse.	Turgut et al., 2004
Acide citrique	Cd, Cr, Ni		Stimulation du transport jusqu'aux feuilles dans le cas de Cr. Possible diminution de la biomasse due à une forte remobilisation des métaux.	
Acide citrique	Cd, Cu, Pb, Zn	<i>Sinapis alba</i> (moutarde jaune), <i>Lolium perenne</i> (raygrass), <i>Lupinus hartwegii</i> (lupin)	Absorption plus importante des métaux par <i>Sinapis alba</i> , qui est un hyperaccumulateur. Faible absorption par <i>Lolium perenne</i> et <i>Lupinus hartwegii</i> .	Römkens et al., 2002
Acide citrique	Pb, Cd	<i>Raphanus sativus</i> (radis)	Diminution de la toxicité de Pb et de Cd. Stimulation du transport jusqu'aux feuilles dans le cas de Cd. Accumulation de Pb dans les racines.	Chen et al., 2003

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique ; HEDTA : acide hydroxy-éthylène-diamine-tétraacétique ; DTPA : acide diéthylène-triamine-pentaacétique ; EGTA : acide éthylène-glycol-tétraacétique ; EDDHA : acide éthylène-diamine-dihydroxyphényl-acétique ; EDDS : acide [S,S] éthylène-diamine-disuccinique.

I.4. Conclusion & Hypothèses

La phytoremédiation des sols pollués apparaît comme une alternative possible aux techniques destructives de traitement des sols telles que l'incinération et le confinement. Par rapport à l'ensemble des techniques conventionnelles physico-chimiques de traitement des sols, la phytoremédiation a l'avantage d'être moins coûteuse, plus extensive et plus respectueuse des caractéristiques des sols.

La phytoremédiation repose sur les interactions dans le système sol-plante-microorganismes, en particulier au niveau de la rhizosphère. La rhizosphère est en effet une zone d'activité biologique intense qui modifie les conditions physico-chimiques du sol global et par conséquent la spéciation des métaux, leur mobilité dans le sol et leur biodisponibilité pour la plante. La croissance de la plante induit des flux d'eau et de solutés à l'interface sol-racine, modifiant ainsi la composition de la solution du sol dans l'environnement racinaire. Les racines excrètent des ions ou des composés organiques dans le sol (protons, ligands et acides organiques, enzymes, CO₂, etc.). Enfin, l'activité microbienne dans la rhizosphère conduit à l'excrétion d'agents complexants extracellulaires. Ces différentes actions modifient les conditions physico-chimiques dans la rhizosphère (pH, potentiel d'oxydoréduction, etc.) et affectent ainsi la composition du sol, la spéciation des métaux (dissolution et précipitation de minéraux, adsorption, désorption, complexation, etc.), et par conséquent, le prélèvement et l'incorporation des métaux par la plante. La plante apparaît comme le moteur essentiel de l'exportation d'un polluant.

Nos hypothèses de travail sont les suivantes. Les approches existantes en phytodécontamination des sols pollués par des métaux lourds, en particulier, la phytoextraction par des plantes hyperaccumulatrices et la phytoextraction par des plantes tolérantes, assistée ou pas par des chélatants, nécessitent généralement un temps long de traitement, de quelques années à quelques dizaines d'années selon le cas. Pour pouvoir dépolluer le sol dans un temps raisonnable (de l'ordre de 1 à 3 ans), les traitements complémentaires devraient être appliqués au système sol-plante afin d'accroître l'efficacité de la phytoremédiation. Les plantes, hyperaccumulatrices ou seulement tolérantes, du fait de leur physiologie, ne peuvent accumuler dans leurs tissus qu'une quantité limitée d'un métal. En revanche, elles peuvent, grâce à des actions racinaires dans la rhizosphère, rendre les métaux dans le sol plus mobiles, et donc potentiellement éliminables. L'optimisation du volume de la rhizosphère, grâce au choix de l'espèce végétale, et un dispositif de traitement permettant de prévenir le lessivage des métaux dans le milieu environnant, semblent être

des paramètres indispensables pour pouvoir obtenir une dépollution satisfaisante, sans risques, et dans un temps raisonnable.

L'objectif général de cette étude est, d'une part, de développer une solution de la phytoremédiation combinée avec des traitements physico-chimiques complémentaires, selon le principe de Jardins Filtrants, afin de pouvoir dépolluer un sol dans un temps de traitement raisonnable, et d'autre part, d'explicitier les mécanismes de remobilisation et d'immobilisation des métaux, et plus particulièrement du zinc et du cuivre, intervenant dans le système sol-plante lors de la phytoremédiation. Nous aborderons ce point au travers de l'étude d'un sol agricole avec un enrichissement anthropique en plusieurs métaux, et en particulier, en zinc, cuivre et plomb, provenant d'une irrigation massive et prolongée du sol par des eaux usées brutes.

Le premier volet de l'étude consistera à identifier et à quantifier les formes chimiques et structurales (spéciation) sous lesquelles se trouvent le zinc et le cuivre dans le sol initial avant phytoremédiation, *in situ* dans les conditions du champ agricole, ainsi qu'à mesurer la solubilité des métaux *in vitro* avec des différents chélatants, en vue de formuler des hypothèses quant à la mobilité des métaux et à leur évolution lors du traitement. Ces résultats permettront également de connaître des espèces chimiques qui libèrent le zinc et le cuivre en solution en présence des chélatants.

Le second volet consistera à mettre en œuvre l'expérience de la phytoremédiation de ce sol avec l'approche de Jardins Filtrants sur un site pilote, avec diverses combinaisons sol - plante / traitement physico-chimique. Deux traitements physico-chimiques complémentaires susceptibles d'influencer la mobilité des métaux seront appliqués au système sol-plante : l'irrigation à l'eau avec une alternance des périodes d'hydromorphie et d'assèchement, et l'ajout d'un réactif chélatant.

Le troisième volet consistera à identifier et à quantifier les formes chimiques et structurales du zinc et du cuivre dans le sol après phytoremédiation avec diverses plantes suivant diverses modalités et à évaluer les changements la spéciation du zinc et du cuivre dans le sol par rapport à l'état initial. Ces résultats permettront de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la phytoremédiation.

CHAPITRE II. Matériels & Méthodes

La démarche expérimentale de ce travail consiste à appliquer une approche multi-techniques et multi-échelles, en menant les investigations au niveau macroscopique et au niveau microscopique. Au niveau macroscopique, il s'agit tout d'abord de conditionner et de mettre en œuvre, à l'échelle d'un site pilote, un « jardin filtrant » grandeur nature décliné en prototypes permettant de tester différentes combinaisons sol - espèce végétale / traitement physico-chimique dans le dispositif des casiers. Il s'agit ensuite de mesurer les concentrations des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation, de mesurer la biomasse des plantes et les concentrations des métaux dans les plantes (racines et parties aériennes) à la fin de la phytoremédiation, et ceci afin d'établir le bilan de la phytoremédiation en termes de concentrations totales. Le cœur de ce travail repose sur la caractérisation de la spéciation du zinc et du cuivre dans la phase solide du sol, et ceci afin de mettre en évidence les changements de la spéciation induits par la phytoremédiation. Au niveau microscopique, il s'agit d'identifier les formes chimiques et structurales du zinc et du cuivre dans le sol avant et après phytoremédiation. Pour cela, les échantillons non-perturbés de sols, préparés sous forme de lames minces, sont étudiés par l'utilisation combinée des techniques physiques de micro-analyses latéralement résolues (μ SXRF, μ XRD, μ EXAFS). La spéciation moyenne du zinc et du cuivre dans le sol avant et après phytoremédiation est quantifiée à l'échelle macroscopique par l'utilisation de la spectroscopie EXAFS non-résolue latéralement, appliquée sur les échantillons moyens de sols en poudre.

II.1. Site pollué de la plaine de Pierrelaye

Le sol pollué utilisé pour la phytoremédiation dans ce travail provient du site agricole de la plaine de Pierrelaye, pollué par des métaux lourds suite à l'irrigation massive et prolongée par des eaux usées non traitées. Cette partie présente l'origine et le caractère de la pollution de ce site, qui est un cas d'étude typique de la pollution des terres agricoles par l'épandage d'eaux usées brutes et de boues.

II.1.1. L'historique

Pendant un siècle (1899 - 1999) la plaine agricole de Pierrelaye (Val-d'Oise) constituait l'exutoire privilégié des eaux usées de la ville de Paris (Figure II.1). A la fin du 19^{ème} siècle, cette solution avait un triple avantage : éliminer les eaux usées, irriguer les cultures et fertiliser les terres agricoles (Védry et al., 2001).

En effet, l'accroissement de la consommation d'eau dans l'agglomération parisienne durant la seconde moitié du 19^{ème} siècle provoque un afflux d'eaux usées dans la Seine. Ces eaux doivent être évacuées, si possible gravitairement. La Seine autour de Paris effectue des méandres importants. En coupant le premier, les eaux usées de Paris parviennent entre Asnières et Gennevilliers, qui, à l'époque, n'ont que quelques centaines d'habitants. Rapidement le site est saturé et il faut trouver d'autres solutions. Les idées ne manquent pas. Ainsi, on construit un collecteur vers la Somme, avec des prises d'eau et des compteurs d'engrais liquide le long des canaux. En 1875, on projette même la création d'un collecteur entre Paris et la Manche, l'idée est soutenue par Pasteur. Un canal d'irrigation sort de Paris par le Nord-Ouest, à Clichy, coupe les méandres de la Seine et parvient à Achères et Triel. Il fonctionne uniquement par gravité. Des équipes d'hydrauliciens sont en plein travail dans le pays, ils ont déjà aménagé les canaux d'irrigation au pied des Alpes, le canal de la Neste dans les Pyrénées, assaini les marais des Landes, de la Dombes et de Sologne. On leur confie le problème des eaux usées de Paris. Une solution durable doit être rapidement trouvée expliquent les hygiénistes. Alors que Haussmann reconstruit Paris, les ingénieurs Belgrand, Mille, Durand-Claye, Bechmann, Launay et d'autres vont organiser la collecte des eaux usées en créant le réseau d'égouts actuel. Ne connaissant guère les méthodes d'épuration biologique (un peu postérieures), ils s'orientent vers l'épuration agricole. A l'époque les vidangeurs récupèrent les déjections et les épandent sur les cultures autour de la ville. La loi du 10 juillet 1894 dite « tout à l'égout, rien dans la Seine » impose la création d'un chenal d'assainissement qui sera construit au nord-ouest de Paris. Les élus de Seine-et-Oise réagissent violemment et le collecteur doit être prolongé plus loin. Un an plus tard la

canalisation est terminée entre Clichy et Achères. En 1899, sont créées les dérivations de Mery - Pierrelaye puis celle de Triel. 28 kilomètres de tuyaux sont posés. On y ajoute des usines qui élèvent l'eau, des siphons qui passent sous le fleuve, des conduites souterraines pour franchir les reliefs, et les eaux usées brutes se déversent dans les champs agricoles. Il suffit d'ouvrir les vannes... Certaines sont encore en place, témoins de ce passé. En 1906, 2000 hectares de champs sont ainsi irrigués dans la plaine de Pierrelaye recevant 40000 m³ d'eaux usées par hectare et par an (soit une lame d'eau moyenne de 4 m). Les exploitations agricoles produisent des légumes et des céréales.

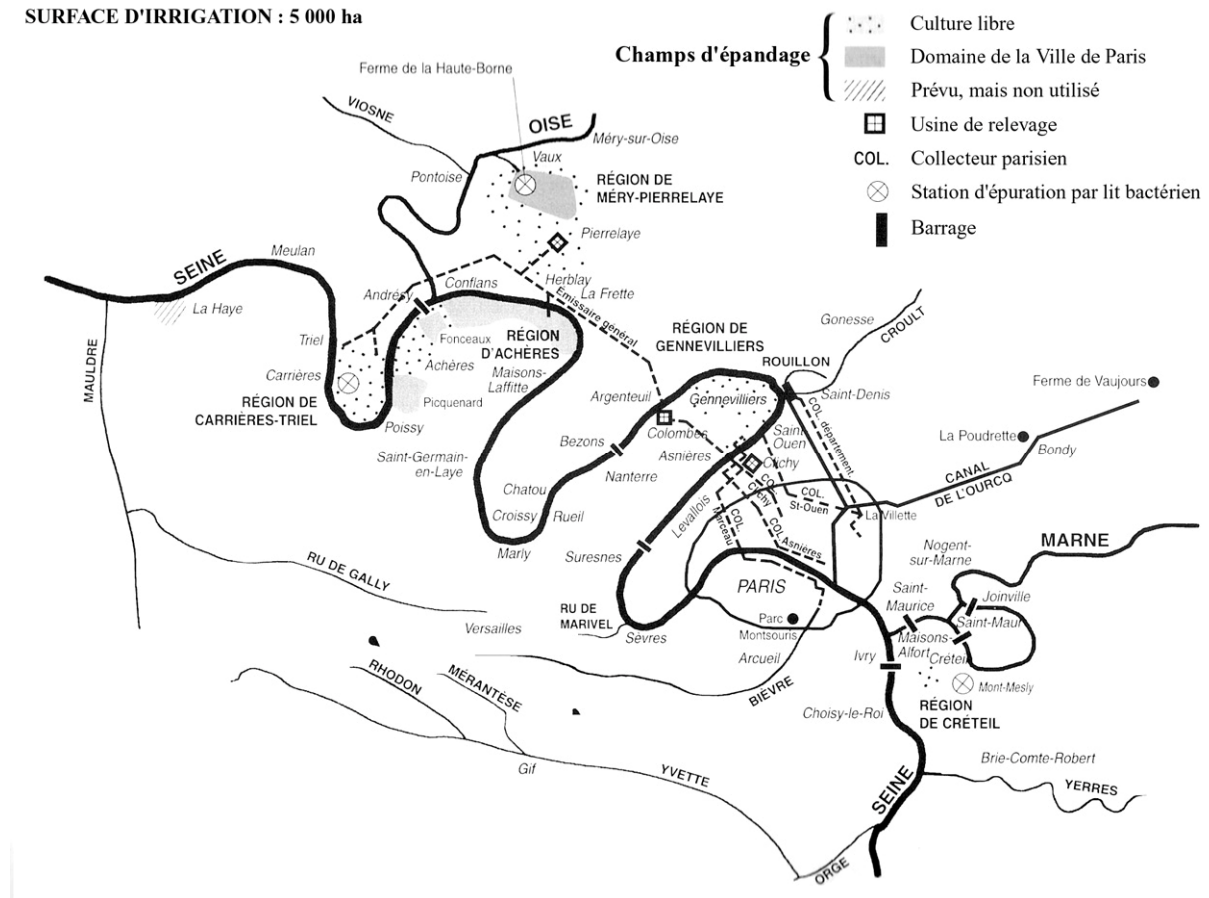


Figure II.1. Carte de l'assainissement parisien entre 1900 et 1910 (source : Védry, 1996).

Cette méthode durera plus d'un siècle, même si entre temps la première station d'épuration d'Achères viendra absorber une partie des eaux usées, l'irrigation à base d'eaux brutes continuera jusqu'en 1999, elle soulagera la station d'Achères saturée. Sous la pression d'associations de protection de la nature et des consommateurs, ce déversement cessera. La constatation des concentrations excessives en plomb et en cadmium dans les sols et de l'accumulation de ces éléments dans les cultures entraînera l'interdiction par le

Conseil Supérieur d'Hygiène de France de vendre des produits de cultures alimentaires (légumes, céréales et plantes aromatiques) de ce site. Les agriculteurs seront reconvertis. Un suivi agronomique des terres sera mis en place, et la monoculture de maïs sera à vocation non alimentaire, mais industrielle. Il se pose désormais la question de la dépollution de ces terres afin qu'elles retrouvent une valeur agronomique. Des projets de recherches en matière du risque de transfert des métaux dans la chaîne alimentaire et de migration des métaux vers les eaux souterraines, ainsi qu'en matière de la faisabilité de phytoremédiation de ces sols sont entrepris depuis (étude EPANDAGRI, INRA) (Baize et al., 2002).

En France, avec la construction des stations d'épuration des eaux usées, l'irrigation des terres agricoles avec des eaux usées brutes a été progressivement abandonnée. En revanche, cette pratique est encore courante dans de nombreux pays où l'usage de l'eau doit être optimisé du fait de l'aridité du climat et où les moyens d'épuration sont encore insuffisants. C'est notamment le cas sur le pourtour sud de la Méditerranée, en raison des besoins en eaux d'irrigation, quelle que soit leur qualité. Dans ce contexte, l'étude du sol de ce site pollué de longue date par l'irrigation d'eaux usées offre un recul aux pays qui utilisent encore cette pratique et qui doivent gérer les risques à terme de la pollution qui en résultent.

II.1.2. Caractéristiques de la pollution

La pollution des sols, suite à l'irrigation des eaux usées brutes, présente un caractère particulier, car elle est amenée par des flux d'eaux de plus ou moins grande quantité, et de façon hétérogène dans l'espace et dans le temps, à la différence d'une pollution plus diffuse par dépôt atmosphérique, par exemple. Outre les polluants métalliques, les eaux usées apportent au sol de la matière organique et des sels, qui modifient la constitution et les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol. Ainsi, dans les sols ayant reçus des eaux usées, on observe souvent les phénomènes de salinisation et de colmatage dus à l'accumulation des sels et des particules organiques dans l'horizon de surface. Il en résulte une diminution de la conductivité hydraulique, ce qui augmente le ruissellement et diminue l'infiltration (Agassi et al., 2003; Viviani and Iovino, 2004). L'apport des sels favorise généralement la migration des métaux dans le sol. Les interactions entre les métaux et la matière organique peuvent entraîner soit un stockage soit un relargage des métaux, suivant les conditions physico-chimiques du sol (Lamy et al., 2006).

Les sols agricoles de la plaine de Pierrelaye se sont développés dans une formation sablo-calcaire remaniée issue du calcaire de Saint-Ouen, des sables de Beauchamp et du calcaire du Lutétien. Se sont des Luvisols sableux, qui présentent de haut en bas : un

horizon cultivé et labouré épais (0.4 à 0.6 m), riche en carbone organique (2 à 3 %), un horizon éluvial pauvre en argile, en matière organique et en oxyhydroxydes de fer (0.2 m), un horizon illuvial sablo-argileux (0.2 m) contenant 18 % d'argile, et un horizon sableux calcaire (0.25 m) contenant 30 % de CaCO_3 (Dère et al., 2006b). Le fond géochimique naturel en éléments métalliques, estimé à partir d'un sol non pollué en dehors de la zone d'irrigation, correspond à 35 mg/kg en Zn, 7 mg/kg en Cu et 9 mg/kg en Pb, dans les horizons de subsurface (Dère et al., 2007).

Suite à l'irrigation massive et prolongée par des eaux usées, ces sols contiennent une pollution importante, hétérogène et polymétallique de l'horizon de surface, dominée en termes de concentration, par le zinc, le plomb, le cuivre et le chrome. Les métaux sont concentrés essentiellement (98 % de teneurs totales) dans l'horizon de surface, cultivé et labouré, où ils se sont incorporés progressivement, soit directement avec l'infiltration de l'eau, soit mécaniquement suite aux labours annuels (Baize et al., 2002; Bourennane et al., 2006; Dère et al., 2006a; Dère et al., 2006b).

L'irrigation de la plaine a été organisée par îlots, ou champs d'irrigation, entités d'une dizaine d'hectares constituées par une ou plusieurs parcelles, et entourées des bouches d'irrigation. Les teneurs en métaux dans l'horizon de surface d'un champ d'irrigation varient à l'échelle d'un hectomètre et parfois même d'un décamètre. Une étude de la distribution spatiale de la pollution, effectuée à partir de 87 échantillons de sol de l'horizon de labour prélevés de manière aléatoire sur un îlot d'irrigation de 15 ha situé au nord de la plaine, a estimé que les concentrations de six principaux éléments traces observées dans l'horizon de surface à l'échelle de cet îlot varient de 340 à 1380 mg/kg de Zn, de 140 à 700 mg/kg de Pb, de 85 à 365 mg/kg de Cu, de 40 à 160 mg/kg de Cr, de 15 à 31 mg/kg de Ni, et de 1.2 à 9.2 mg/kg de Cd (Bourennane et al., 2006). Les variations des concentrations sont dues à l'écoulement des eaux usées à la surface en fonction de la topographie du terrain et de la géométrie du réseau d'irrigation. De manière générale, à l'échelle d'un champ d'irrigation, le gradient des concentrations des éléments traces correspond à l'écoulement des eaux brutes à partir des bouches d'irrigation suivant le sens de la pente et du labourage et à la sédimentation des particules présentes dans des eaux brutes. Ainsi, les plus fortes concentrations sont observées à proximité des bouches d'irrigation (dépôt rapide des particules les plus grossières) et dans les zones de replat de faible pente (<1.2 %) où l'infiltration de l'eau et la sédimentation des particules sont les plus importantes (Dère et al., 2007).

II.2. Approche originale de la phytoremédiation

Ce travail porte sur une approche nouvelle et originale de la phytoremédiation selon le procédé « Jardins Filtrants » mis en œuvre par l'entreprise française Phytorestore. De manière générale, les Jardins Filtrants sont conçus comme des espaces paysagers réservés au traitement de la pollution des eaux, de l'air et des matrices solides (sols, sédiments, boues) par phytoremédiation dans des écosystèmes artificiels recréés dans des casiers végétalisés avec des plantes de milieux humides. Le procédé est basé globalement sur le principe de fonctionnement des zones humides reconstituées (anglais : constructed wetlands). Plus particulièrement, pour le traitement de la pollution métallique dans des matrices solides, les Jardins Filtrants visent à favoriser la remobilisation et la lixiviation des métaux présents dans la matrice, par le biais de l'action combinée des plantes de milieux humides et de l'irrigation, pour extraire les métaux du sol, puis les piéger dans un filtre en tourbe.

Dans ce travail, l'approche de la phytoremédiation selon le procédé de Jardins Filtrants a été appliquée sur un site pilote, dans un dispositif représentant un « jardin filtrant » grandeur nature afin de comprendre des mécanismes mis en jeu lors de la phytoremédiation avec diverses espèces végétales de milieux humides, divers modes d'irrigation, assistée ou pas par un traitement chimique avec un chélatant.

II.2.1. Principes de la phytoremédiation par Jardins Filtrants

La stratégie de la phytoremédiation des sols par Jardins Filtrants repose sur quatre principes fondamentaux :

(1) C'est une phytoremédiation qui vise à restaurer le sol (**phytorestauration**), c'est-à-dire réduire la pollution jusqu'à un niveau nécessaire et suffisant pour que le sol puisse retrouver sa fonction d'usage, en l'occurrence, pour que le sol agricole puisse retrouver sa fonction agricole.

(2) C'est une phytoremédiation **ex situ** dans un dispositif de traitement étanche constitué de plusieurs casiers de traitement, qui contiennent le sol contaminé mis en culture, et d'un casier de piégeage, alimenté par les lixiviats issus des casiers de traitement et contenant la tourbe mise en culture. Ce dispositif permet de collecter les lixiviats chargés en métaux issus du sol pollué et de les concentrer dans un filtre en tourbe d'un volume réduit, ainsi que d'appliquer des traitements complémentaires tels que, par exemple, l'ajout des chélatants, sans risque de leur déversement dans le milieu environnant.

(3) C'est une phytoremédiation active qui vise à dépolluer le sol (**phytodécontamination**), c'est-à-dire extraire ou dégrader des polluants, en l'occurrence, extraire les métaux du sol pour ramener leurs teneurs résiduelles dans le sol à un seuil acceptable. Il est évident que seule la fraction « mobile » ou facilement remobilisable et biodisponible des métaux peut être séquestrée par les racines (phytoséquestration), ou transférée et accumulée dans les parties aériennes des plantes (phytoextraction). Cette fraction des métaux dans le sol est naturellement constituée de formes solubles. Cependant, dans les conditions de la rhizosphère, certaines phases porteuses des métaux peuvent être déstabilisées, à travers des mécanismes variés (oxydoréduction, complexation, etc.), et peuvent ainsi libérer les métaux en solution. Dans notre approche de la phytoremédiation, nous ne cherchons pas à accroître la phytoextraction des métaux, mais à favoriser leur remobilisation dans le sol dans le but de lixivier la fraction remobilisée et ne conserver que la fraction non-disponible pour les plantes. Cette solution de la phytoremédiation est nommée globalement la **phytolixiviation**[®] (anglais : **phytoleaching**[®]) (cf. Jacquet, 2006). Pour favoriser la phytolixiviation, nous utilisons les plantes tolérantes à forte extension et biomasse du système racinaire permettant d'obtenir une grande surface de contact avec le sol et un grand volume de la rhizosphère.

(4) C'est une phytoremédiation **assistée** par des traitements complémentaires. En particulier, pour favoriser la remobilisation et la lixiviation des métaux nous mettons le système sol-plante dans des conditions d'alternance des périodes d'hydromorphie et d'assèchement par le biais de l'irrigation artificielle des casiers par cycles, qui consiste en une période d'arrosages abondants, suivie d'une période sans ou avec peu d'arrosages pour maintenir la culture. Cette alternance est susceptible de modifier les conditions physico-chimiques dans le système sol-plante et de déstabiliser ainsi des phases porteuses sensibles aux conditions redox (oxydes de Fe et de Mn, sulfures, matière organique, etc.). L'alternance inondation/assèchement nécessite l'utilisation des plantes bien adaptées à ces conditions, comme c'est le cas des plantes de milieux humides. En effet, ces plantes développent des adaptations morphologiques, anatomiques et métaboliques leur permettant de survivre dans des conditions d'inondation (Jackson, 1998). En particulier, des plantes de milieux humides, comme, par exemple, le roseau commun (*Phragmites australis*), développent des systèmes vasculaires uniques qui leur permettent de transporter l'oxygène des feuilles vers les racines à travers des canaux d'aérenchymes et d'émettre l'oxygène dans le sol (Armstrong, 1979; Kawase and Whitmoyer, 1980; Brix, 1994). En outre, grâce à la modularité de son système racinaire, *Phragmites australis*, comme d'autres plantes à rhizomes (tiges souterraines), se reproduit, en plus, par multiplication des rhizomes et peut s'adapter aux modifications du milieu. En cas d'assèchement important, cette plante diminue son système aérien et développe des rhizomes préférentiellement en profondeur. En

contrepartie, en cas de submersion importante, elle peut produire de longs rhizomes horizontaux très rapidement.

L'objectif principal de ce travail est de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la phytoremédiation avec l'approche de Jardins Filtrants. La démarche que nous avons adoptée pour répondre à cet objectif consiste à conduire l'expérience de la phytoremédiation en conditions réelles et en vraie grandeur, sur un site pilote représentant un « jardin filtrant » grandeur nature, et dans des conditions opératoires proches de celles habituellement utilisées dans le procédé Jardins Filtrants. Celles-ci reposent sur un dispositif des casiers, végétalisés avec des plantes de milieux humides et irrigués de sorte à créer un environnement proche de celui des zones humides. Plusieurs conditions opératoires de ce dispositif, comme la configuration des casiers, les espèces végétales et les modes d'irrigation ont été reproduites sur le site pilote. Le sol pollué a été mis en culture avec trois espèces végétales de milieux humides couramment utilisées dans des Jardins Filtrants : le roseau commun (*Phragmites australis*), l'iris des marais (*Iris pseudacorus*) et le saule des vanniers (*Salix viminalis*). Les cultures ont été soumises au traitement par l'irrigation artificielle à l'eau avec une alternance hydromorphie/assèchement. En outre, sur ce site pilote nous avons testé un traitement chimique avec un réactif chélatant, le citrate. De manière générale, les réactifs complexants ou chélatants ayant une forte affinité pour les éléments métalliques entrent en compétition avec les constituants du sol auxquels les métaux sont fixés. Une partie du stock de métaux passe alors en solution sous forme de complexes métal-chélate stables et solubles. Le choix du citrate a été fait suite à notre étude préliminaire de la solubilité des métaux dans le sol initial, au laboratoire avec trois complexants (citrate, EDTA et EDDS). Les résultats de cette étude seront présentés dans le chapitre III.

II.2.2. Configuration et instrumentation du site pilote

Le site pilote a été mis en place en mai 2002 à côté d'Avrigny (Oise), situé à environ 100 km au nord-ouest du site contaminé de la plaine de Pierrelaye (Val-d'Oise). Les régions du site contaminé et du site pilote ont le même climat tempéré, avec une moyenne de la température annuelle de 10°C et des précipitations annuelles de 800 mm.

Un volume de 22 m³ de sol pollué a été prélevé par excavation sur une bande d'environ 22 m de longueur, 2 m de largeur et 0.5 m de profondeur dans un des champs de la plaine de Pierrelaye (Figure II.2).



Figure II.2. Prélèvement du sol de la plaine de Pierrelaye.

Le sol prélevé a été homogénéisé et transporté vers le site pilote, où il a été mis en dépôt dans les casiers de traitement (Figure II.3).



Figure II.3. Mise en dépôt du sol pollué dans les casiers du site pilote.

Le site pilote a été configuré en deux étapes successives de traitement. La première étape consiste à traiter le sol pollué en parallèle dans quatre casiers de phytolixiviation (casiers A, B, C, D, Figure II.4). La deuxième étape consiste à collecter des lixiviats issus de

ces quatre casiers et de les piéger dans un casier de phytosequestration contenant de la tourbe (casier E, Figure II.4). Pour cela, les casiers A, B, C et D sont équipés de systèmes de drainage et sont disposés à la hauteur d'environ 1 m par rapport au casier E afin d'utiliser l'écoulement gravitaire pour le transfert des lixiviats. Ainsi, les lixiviats chargés en métaux sont collectés en permanence et piégés sur le site, dans un filtre en tourbe d'un volume réduit, sans risque de transfert dans le milieu environnant.

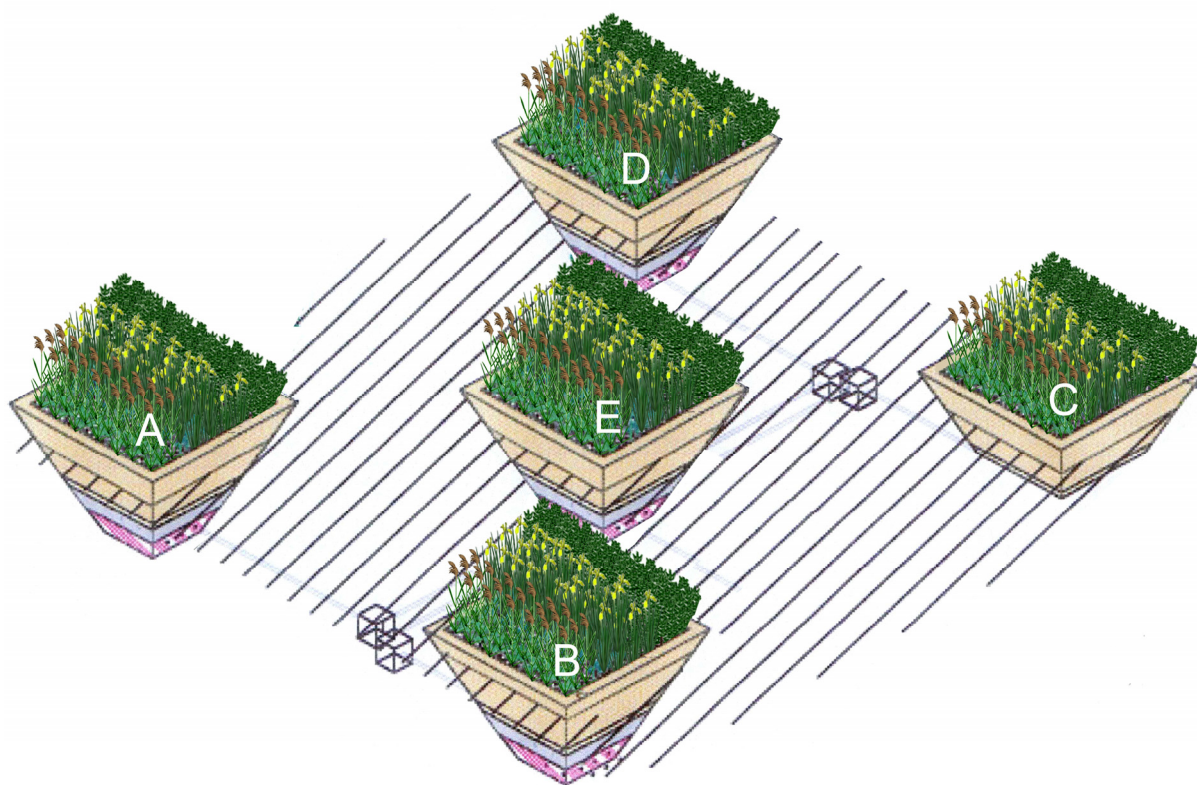


Figure II.4. Schéma du site pilote.

Les casiers ont été creusés dans le sol, et isolés du sol par une paroi étanche constituée d'une couche d'argile de 0.15 m d'épaisseur, d'une bâche imperméable et d'un film anti-racinaire. Les casiers ont été construits de dimensions identiques, sous forme de pyramides régulières tronquées, à base carrée, dont les faces sont des trapèzes isocèles (Figure II.5). Les principales caractéristiques du casier sont regroupées dans le tableau II.1. Le fond des casiers a été équipé d'un massif drainant recouvert d'une géo-membrane et constitué d'une couche de gravier de 0.5 m d'épaisseur et des drains en PVC disposés en pente (environ 2 %) et perforés sur leur surface supérieure afin de collecter et d'évacuer les lixiviats. Le gravier a été utilisé, d'une part, comme un filtre mécanique pour assurer une perméabilité du casier permettant le lessivage des fractions des métaux en solution, ainsi que des fractions fines en suspension, et d'autre part, comme un substrat inerte offrant une

large surface pour le développement de la population microbienne. Le massif drainant à la base des casiers est relié à un système d'aération pour améliorer l'assèchement (Figure II.5).

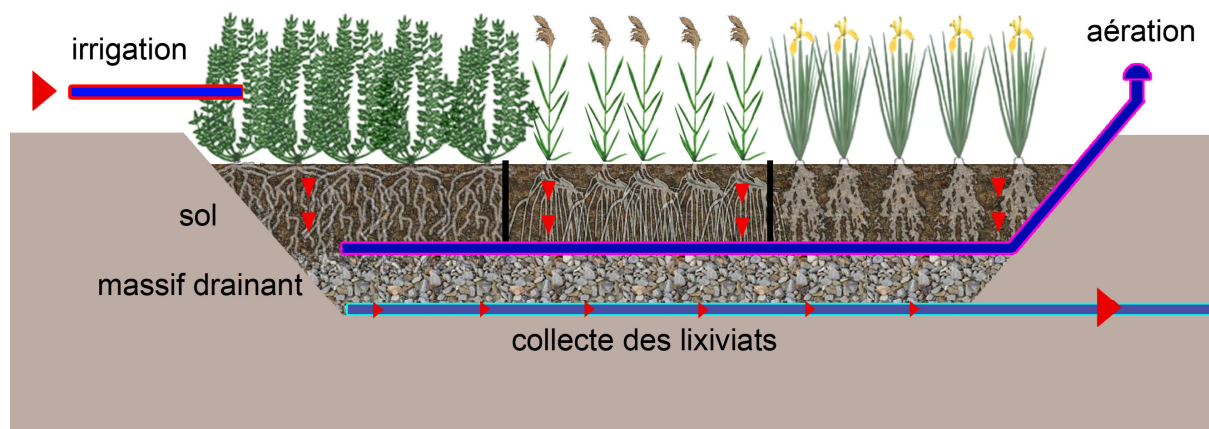


Figure II.5. Schéma latéral du casier.

Le volume total de 22 m³ de sol pollué a été déposé dans quatre casiers (A, B, C, D), par-dessus du massif drainant jusqu'à la surface des casiers à raison d'une couche de 0.5 m d'épaisseur correspondant à un volume de 5.4 m³ par casier (A, B, C, D). Sur la base de la densité de 1.5 g/cm³ et du taux d'humidité de 30 %, la masse du sol sec par casier est estimée à 5644 kg (Tableau II.1).

Tableau II.1. Principales caractéristiques du casier.

Surface supérieure du casier	4 × 4 m ²
Surface inférieure du casier	1 × 1 m ²
Profondeur totale du casier	1 m
Epaisseur du massif drainant	0.5 m
Epaisseur de la couche de sol	0.5 m
Volume total du casier	7 m ³
Volume du sol	5.4 m ³
Masse du sol (m.h.) ¹	8063 kg
Masse du sol (m.s.) ²	5644 kg

¹ Masse du sol humide à partir d'une densité de 1.5 g/cm³.

² Masse du sol sec à partir d'un taux d'humidité de 30 %.

Les casiers ont été mis en culture avec trois espèces végétales de milieux humides : *Phragmites australis*, *Iris pseudacorus* et *Salix viminalis*. Afin d'étudier la phytoremédiation avec chacune des espèces, les casiers ont été divisés en trois compartiments distincts avec des films anti-racinaux étanches, chaque compartiment étant mis en culture avec une seule espèce végétale (Figure II.6). La plantation a été effectuée en jeunes plants en godets, à raison de 10 plants par compartiment soit une densité de 2 plants par m². Chaque compartiment végétalisé contient alors un volume de sol de 1.8 m³, soit une masse du sol sec de 1881 kg soumise à l'action de 10 plantes.



Figure II.6. Vues des compartiments végétalisés du casier.

Parmi les quatre casiers contenant le sol pollué, trois casiers : casier dit « témoin », casier dit « redox » et casier dit « citrate », ont été étudiés dans le cadre de cette thèse. La dénomination des casiers est conventionnelle, elle ne décrit pas explicitement les traitements appliqués. En effet, les trois casiers ont été exposés à des précipitations naturelles, mais aussi soumis au traitement par l'irrigation artificielle à l'eau, afin de réaliser des cycles d'oxydoréduction. Ce traitement consiste à alterner des périodes d'arrosages abondants, pour permettre l'inondation des casiers, et des périodes sans ou avec peu d'arrosages aux pieds des plantes, pour permettre l'assèchement des casiers. Deux modes d'irrigation, avec des arrosages abondants plus ou moins fréquents et des périodes d'assèchement plus ou moins longues, ont été testés sur le site pilote. Pour le casier « témoin », les arrosages abondants ont été effectués toutes les trois semaines : un arrosage de 1600 L en un jour soit 100 mm en termes de quantité de précipitations (quantité équivalente à 1.5 fois la pluviométrie mensuelle moyenne dans la région), puis pas d'arrosages pendant la première semaine, suivi des arrosages minimaux de 100 L soit 6 mm par jour pendant cinq jours consécutifs lors de la deuxième et la troisième semaine, et ainsi de suite. Pour le casier « redox », les arrosages abondants ont été effectués avec une fréquence hebdomadaire : un arrosage de 1600 L en un jour, puis pas d'arrosages pendant la semaine. Le casier « citrate » a été soumis aux mêmes conditions d'irrigation que le casier « témoin », mais aussi à un traitement chimique complémentaire au citrate. Le citrate a été appliqué sous

forme d'une solution 0.05 M (solution tampon d'acide citrique et d'hydroxyde de sodium à pH 5.5) en quatre applications étendues sur quatre semaines, du 23 septembre 2002 au 14 octobre 2002, à raison d'un apport de 1600 L soit 100 mm de citrate une fois par semaine, suivi d'un rinçage abondant avec 1600 L soit 100 mm d'eau quatre jours après.

L'expérience de la phytoremédiation sur le site pilote dans le cadre de ce travail a été menée sur une période de seize mois, de mai 2002 à septembre 2003 (Figure II.7).



Figure II.7. Vues du site pilote à l'état initial (mai 2002) et à l'état final (septembre 2003).

II.3. Prélèvements, préparations et analyses des échantillons

II.3.1. Options méthodologiques

Le dispositif mis en place sur le site pilote permet d'étudier le fonctionnement d'un « jardin filtrant » en conditions réelles et en vraie grandeur. Le remplissage des casiers avec le même sol et la séparation du sol des casiers en compartiments distincts par espèce végétale permet d'évaluer les effets du traitement sur la teneur et la spéciation des métaux dans le sol pour chacune des espèces végétales suivant diverses modalités (modes d'irrigation et apport du citrate). La séparation des compartiments végétalisés permet également d'échantillonner les plantes séparément pour chacune des variantes de traitement afin de déterminer les quantités des métaux accumulés dans les tissus végétaux.

Toutefois, ce dispositif présente quelques limites inhérentes à la conception de casiers, en particulier pour la mesure du flux de la lixiviation : (i) le fond des casiers de traitement est équipé d'un massif drainant avec des drains disposés en pente (environ 2 %) pour permettre l'évacuation des lixiviats et leur transfert vers le casier de tourbe, ce design permet d'obtenir un bon drainage des casiers et une bonne évacuation des lixiviats, mais il n'est pas adapté aux prélèvements directs et continus des lixiviats dans les drains ; (ii) les

drains au fond des casiers ne sont pas séparés en fonction des compartiments végétalisés, ce qui ne permet pas de collecter séparément les lixiviats issus de chacune des espèces végétales à la sortie des casiers. Ce dispositif n'est donc pas adapté à la mesure directe, continue et quantitative du flux de la lixiviation. Par ailleurs, du fait de sa grandeur, et du fait d'un nombre important de variantes de traitement testées en parallèle, ce dispositif n'est pas bien adapté à la conduite de protocoles expérimentaux assez lourds, limitant ainsi la possibilité de multiplier les répétitions des différents traitements et d'augmenter le nombre de réplicas des différents échantillons par traitement.

C'est finalement par un compromis entre les objectifs visés et les contraintes liées aux limites du dispositif, aux coûts d'échantillonnages et d'analyses et au temps de travail nécessaire que la stratégie d'échantillonnage a été mise au point. Pour répondre au principal objectif, qui est de comprendre les mécanismes de remobilisation/immobilisation du zinc et du cuivre, nous avons privilégié de concentrer ce travail sur l'étude de la spéciation des métaux dans la phase solide du sol. Etant donné les limites du dispositif, la méthode choisie pour établir le bilan de la phytoremédiation pour chacune des variantes de traitement consistait à mesurer la concentration des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation, à mesurer la biomasse des plantes et la concentration des métaux accumulés dans les plantes à la fin de la phytoremédiation. La quantité lixiviée du sol peut alors être estimée indirectement d'après la variation du stock dans le sol et la quantité accumulée dans les plantes.

II.3.2. Sol initial avant phytoremédiation

Le sol pollué de la plaine de Pierrelaye avait été caractérisé en termes de distribution des métaux lourds lors de précédentes investigations de l'INRA en 2001-2002. Dans ces études, des prélèvements du sol avaient été réalisés à travers de la plaine, en différents points d'un même champ et dans différents horizons du sol (Baize et al., 2002; Bourennane et al., 2006; Dère et al., 2006a; Dère et al., 2006b). Ces études ont mis en évidence un fort gradient de concentrations des métaux lourds à l'échelle d'un champ d'irrigation, avec une contamination qui est maximale près des bouches d'irrigation des eaux usées, et qui diminue avec éloignement de la source émettrice. Ces travaux ont également montré que la contamination est concentrée essentiellement dans l'horizon de labour. Cette distribution de la pollution est due à l'écoulement des eaux usées à la surface en fonction de la topographie du terrain et de la géométrie du réseau d'irrigation (cf. Partie II.1.2).

Dans notre étude, le sol pollué à son état initial avant phytoremédiation a été échantillonné en deux temps. Dans un premier temps, en mars 2002, un échantillon du sol

initial a été prélevé *in situ* au milieu d'un champ agricole de la plaine, dans l'horizon labouré du sol (0-50 cm), sous forme d'un bloc non-remanié de 15 cm de hauteur, 10 cm de largeur et de 5 cm d'épaisseur. Cet échantillon a été utilisé pour l'étude de la spéciation originelle des métaux, ainsi que pour l'étude au laboratoire de la solubilité des métaux avec des chélatants. Pour cela, l'échantillon en bloc a été lyophilisé, puis une partie du bloc a été incluse dans la résine et conditionnée en lames minces d'une superficie de quelques cm² et de 30 µm d'épaisseur pour les micro-analyses (µSXRF, µXRD, µEXAFS). L'autre partie du bloc a été homogénéisée, tamisée à 2 mm, broyée en poudre < 50 µm dans un mortier mécanique en agate. La poudre du sol a été utilisée pour les macro-analyses : les dosages chimiques des éléments majeurs par ICP-AES et des éléments traces par ICP-MS, les mesures de la solubilité avec des chélatants, et les analyses de la spéciation moyenne des éléments traces (Zn et Cu) par EXAFS. Les analyses de cet échantillon sont détaillées dans le chapitre III. Les concentrations des métaux dans cet échantillon s'élèvent à 1103 mg/kg de Zn, 535 mg/kg de Pb, et 290 mg/kg de Cu.

Pour la mise en place du site pilote, en mai 2002, un volume de 22 m³ de sol pollué a été prélevé par excavation sur une bande d'environ 22 m de longueur, 2 m de largeur et 0.5 m de profondeur. Ce volume de sol a été prélevé sur le même champ que l'échantillon précédent, mais en bordure du champ, près des bouches d'irrigation. Le sol prélevé a été homogénéisé et distribué dans les quatre casiers du site pilote. Ensuite, environ 1 kg de sol a été prélevé dans chacun des quatre casiers, avant la plantation. Les quatre échantillons ont été préparés séparément sous forme de poudre < 50 µm et analysés individuellement par ICP-AES pour les éléments majeurs et par ICP-MS pour les éléments traces. Les moyennes des concentrations calculées pour les quatre échantillons s'élèvent à 2171 mg/kg de Zn, 607 mg/kg de Pb, et 380 mg/kg de Cu. Ce sont des teneurs initiales en métaux dans le sol du site pilote avant phytoremédiation (cf. Chapitre IV).

II.3.3. Sol après phytoremédiation

Durant l'expérience de phytoremédiation, les sols de trois casiers : témoin, redox et citrate, ont été échantillonnés dans chaque compartiment végétalisé lors des deux campagnes de prélèvements : le prélèvement intermédiaire le 30 juin 2003, au bout de quatorze mois de phytoremédiation, et le prélèvement final le 8 septembre 2003, au bout de seize mois de phytoremédiation. Compte tenu du nombre important de variantes de traitement (trois casiers et trois espèces végétales), la totalité des échantillons n'a pas pu être étudiée en détails dans le cadre de cette thèse. Ainsi, le prélèvement intermédiaire du juin 2003 avait pour but de mesurer les teneurs en métaux dans les sols deux mois avant la

fin de la phytoremédiation dans le cadre de ce travail, et de sélectionner les casiers pour l'étude approfondie de la spéciation des métaux dans le sol après phytoremédiation.

Rappelons que chaque variante de traitement a été réalisée dans un compartiment d'une superficie de $4 \times 1.3 \text{ m}^2$ en surface et de $1 \times 0.3 \text{ m}^2$ au fond, contenant une couche de sol de 0.5 m d'épaisseur, végétalisée avec 10 plantes soit une densité de 2 plantes par m^2 . De manière générale, l'action de la plante sur le sol, et plus particulièrement l'influence racinaire, diminue progressivement avec l'augmentation de la distance par rapport aux racines. La région du sol directement soumise à l'action des racines est par définition la rhizosphère. La géométrie de la rhizosphère est donc calquée sur celle du système racinaire des plantes : c'est la région du sol qui entoure les racines. Toutefois, l'extension de la rhizosphère dépend de la structure du couvert végétal, des espèces considérées, de l'âge de la plante, du cortège microbien associé aux racines, et des actions racinaires considérées. Les limites spatiales de la rhizosphère sont de ce fait difficiles à préciser. Sa limite interne se situe en deçà du rhizoderme, dans la mesure où la rhizosphère s'étend à l'intérieur même des tissus racinaires du fait des interactions entre les racines et les microorganismes. Sa limite externe se confond insensiblement avec l'ensemble du volume de sol colonisé par les racines des plantes, prolongées par les hyphes mycéliens associés. Pour les éléments peu mobiles, la rhizosphère se limite au premier mm ($< 1 \text{ mm}$) ou à quelques premiers mm de sol situés autour des racines (Hinsinger, 1998a). Lorsque les racines forment un réseau dense, le gradient de l'influence racinaire peut être observé dans les zones avoisinantes la rhizosphère (Luster et al., 2008). Dans notre cas, durant seize mois de l'expérience, les plantes utilisées ont accompli un cycle végétal annuel complet plus un été. Elles ont développé des systèmes racinaires puissants et ramifiés (Figure II.8) explorant toute la profondeur (0.5 m) de la couche de sol et colonisant la majorité du volume de sol dans un compartiment. Pour tenir compte du gradient spatial d'éloignement par rapport aux racines, des zones de prélèvements de sol ont été définies au niveau du compartiment végétalisé en fonction des zones d'influence racinaire. L'influence racinaire est maximale dans le sol rhizosphérique, qui est situé au contact immédiat des racines soit aux premiers millimètres qui les entourent, et qui est en interaction directe avec les racines. Le sol non-rhizosphérique, qui occupe le restant volume du compartiment, n'est pas en interaction directe avec les racines, mais il peut être influencé par l'activité racinaire indirectement *via* diffusion (0.1-15 mm), flux de masse (quelques cm) et action des hyphes prolongés des champignons mycorhizes (quelques cm). Cette influence est plus prononcée dans le sol proche des racines et s'atténue au fur et à mesure de l'éloignement des racines. Puisque dans notre cas les systèmes racinaires des plantes utilisées forment un réseau racinaire dense, dans un volume de sol fermé et délimité par les bordures du compartiment, le sol non-rhizosphérique le plus éloigné des racines, dans lequel l'influence racinaire est

minimale, se situe en surface et en bordure du compartiment. Ce sol est défini comme le sol non-rhizosphérique extrême. La région du sol intermédiaire entre le sol rhizosphérique et le sol non-rhizosphérique extrême est définie comme le sol non-rhizosphérique moyen. Compte tenu du volume total de sol dans un compartiment (1.8 m^3), de l'épaisseur de la couche de sol (0.5 m), de la densité de plantation (2 plantes/m^2) et des caractéristiques des systèmes racinaires obtenus (Figure II.8), dans un compartiment végétalisé, le volume du sol englobant le sol rhizosphérique et le sol non-rhizosphérique moyen apparaît plus important que le volume du sol non-rhizosphérique extrême.



Figure II.8. Systèmes racinaires des plantes à la fin de la phytoremédiation.

Le sol non-rhizosphérique extrême a été échantillonné de la même manière lors de deux campagnes de prélèvements. Il a été prélevé sous forme de sol remanié, en dehors de tout système racinaire, en surface ($\sim 0\text{-}10 \text{ cm}$) et en bordure de chaque compartiment végétalisé. Les sols rhizosphériques ont été échantillonnés en juin 2003 en vue de mesurer et de comparer les teneurs en métaux lourds pour différentes variantes de traitement. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'échantillonnage la plus immédiate et rustique, qui consiste à retirer une plante du sol, à la secouer de manière à faire tomber le sol faiblement adhérent aux racines, puis à broser le système racinaire afin de récupérer les particules du sol qui adhèrent encore aux racines. Ce sol est considéré comme rhizosphérique par nombre d'auteurs. L'adhésion aux racines des particules de sol résulte de l'action combinée de divers éléments, comme la présence de poils racinaires ou d'hyphes fongiques, l'exsudation de polysaccharides, etc. (Luster et al., 2008). Cette méthode d'échantillonnage permet de collecter du matériel rhizosphérique pour les macro-analyses, mais elle ne permet pas de préserver la structure de la rhizosphère. Par ailleurs, la séparation du sol rhizosphérique du sol non-rhizosphérique avec cette méthode est approximative et définie opérationnellement, car la texture et l'humidité du sol influencent la quantité du sol adhérent aux racines. Tous les échantillons de sols obtenus en juin 2003 ont été lyophilisés, homogénéisés, tamisés à 2 mm , broyés, puis analysés par ICP-MS afin de mesurer et de comparer les teneurs en métaux lourds pour différentes variantes de traitement.

A la fin de l'expérience de phytoremédiation dans le cadre de ce travail, en septembre 2003, les sols ont été échantillonnés en vue de mesurer les rendements de la phytoremédiation en termes de concentration des métaux et de déterminer les changements de la spéciation des métaux induits par la phytoremédiation. Deux zones de prélèvement ont été définies pour chaque compartiment végétalisé : le sol en dehors du système racinaire (sol non-rhizosphérique extrême) et le sol au niveau du système racinaire (sol rhizosphérique + sol non-rhizosphérique moyen). Le sol non-rhizosphérique extrême a été échantillonné de la même manière qu'en juin 2003, sous forme de sol remanié, en surface (~0-10 cm) et en bordure du compartiment végétalisé. Le sol au niveau du système racinaire a été prélevé de manière à obtenir un échantillon qui préserve la structure et la composition du sol dans l'environnement proche des racines où les effets de la plante sont les plus visibles, et qui représente le mieux possible le sol du compartiment. Pour cela nous avons recouru au prélèvement au milieu de la couche de sol, d'une profondeur totale de 0-50 cm, colonisée par les racines, des blocs non-remaniés de 15 cm de hauteur, 10 cm de largeur et de 5 cm d'épaisseur qui correspondent alors au profil à profondeur d'environ 17-32 cm de la couche de sol. Les échantillons en blocs non-remaniés sont constitués par un ensemble des racines, du sol situé à leur contact immédiat soit aux premiers millimètres qui les entourent (sol rhizosphérique) et du sol non-rhizosphérique proche et moyennement éloigné des racines (sol non-rhizosphérique moyen). Cette méthode d'échantillonnage permet de tenir compte de la continuité physique, chimique et biologique entre les racines et le sol. Le sol contenu dans les blocs représente le mieux le sol d'un compartiment végétalisé, tant quantitativement que qualitativement, car il tient compte de deux régions de sol (sol rhizosphérique et sol non-rhizosphérique moyen) majoritaires dans le volume de sol du compartiment, et il représente le mieux possible les effets de la plante. Par ailleurs, le prélèvement en bloc contenant un ensemble non-séparé du sol rhizosphérique et du sol non-rhizosphérique permet de tenir compte des flux entre ces deux régions. En effet, le système sol-plante est un système dynamique du fait de la croissance végétale et des flux continus des éléments entre le sol rhizosphérique et le sol non-rhizosphérique, qui entraînent un appauvrissement ou un enrichissement de telle ou telle région selon l'élément. Le prélèvement du sol à un moment de temps est un prélèvement statique. L'avantage d'un échantillon en bloc comprenant les deux régions non-séparées de sol, c'est qu'il représente une moyenne entre les concentrations des éléments dans le sol rhizosphérique et dans le sol non-rhizosphérique. Les blocs non-remaniés permettent de conditionner par la suite deux types d'échantillons : les échantillons consolidés en lames minces pour les micro-analyses et les échantillons en poudre pour les macro-analyses. Les blocs non-remaniés ont été prélevés dans chaque compartiment des casiers à la fin de la phytoremédiation, puis lyophilisés. Une partie des blocs a été incluse dans la résine et conditionnée en lames minces

d'une superficie de quelques cm² et de 30 µm d'épaisseur pour les micro-analyses de la spéciation (µSXRF, µXRD, µEXAFS). Le sol de l'autre partie des blocs a été séparé des racines, homogénéisé, tamisé à 2 mm, puis broyé en poudre < 50 µm dans un mortier mécanique en agate. La poudre a été utilisée pour les analyses chimiques (ICP-AES, ICP-MS), et conditionnée en pastilles pour les macro-analyses de la spéciation (EXAFS).

II.3.4. Plantes

Les échantillons des plantes ont été prélevés dans chacun des compartiments végétalisés des casiers à la fin de l'expérience de phytoremédiation dans le cadre de ce travail, en septembre 2003, après seize mois de phytoremédiation. Du fait de grandes tailles des plantes utilisées dans ce travail, leur manipulation et préparation sont particulièrement laborieuses et nécessitent un temps de travail important. Etant donné cette contrainte et aussi un nombre important de variantes de traitement (trois espèces végétales suivant trois modalités de traitement), l'échantillonnage des plantes a été limité à une plante par compartiment, sans réplication. Les plantes ont été prélevées en entier, puis séparées du sol, lavées à l'eau de ville et rincées à l'eau ultra-pure. Les parties aériennes et les racines des plantes ont été séparées, puis séchées à 65°C et pesées pour déterminer les masses sèches. Les parties végétales ont été ensuite réduites en poudre au moyen d'un broyeur. Les analyses chimiques des poudres des plantes ont été réalisées par ICP-AES pour les éléments majeurs et par ICP-MS pour les éléments traces.

II.3.5. Lixiviats

Etant donné les objectifs de ce travail et les limites du dispositif énoncées précédemment, dans le cadre de ce travail, le flux de la lixiviation n'a pas été mesuré à partir des lixiviats, mais estimé d'après les mesures directes des métaux dans le sol et dans les plantes. Toutefois, pour avoir une information sur les conditions physico-chimiques dans les casiers et sur la migration des éléments vers les lixiviats au cours du traitement, les lixiviats ont été suivis de manière périodique, à des moments espacés dans le temps lors de l'expérience de la phytoremédiation. Pour cela, des échantillons des lixiviats ont été prélevés, à l'aide d'une pompe manuelle, dans les regards situés à la sortie des casiers et contenant des mélanges des lixiviats issus de trois compartiments végétalisés. Les paramètres physico-chimiques (pH, Eh) ont été mesurés directement sur place, à l'aide d'une sonde multi-paramètre. Les échantillons prélevés ont été ensuite filtrés à 0.45 µm,

stabilisés avec HNO_3 (65 %) et conservés à froid avant les analyses chimiques des éléments par ICP-AES.

II.4. Approche moléculaire de la spéciation

L'approche classique traditionnellement employée en sciences du sol pour étudier la spéciation des métaux dans les matrices solides est une approche chimique. Celle-ci repose sur l'utilisation de différents réactifs chimiques qui, selon leurs propriétés, extraient une partie plus ou moins importante des métaux d'un échantillon du sol. La spéciation dans ce contexte est approchée de façon indirecte, définie opérationnellement. Les métaux extraits sont répartis d'une manière arbitraire, en fonction de leur appartenance à des familles chimiques de composés, car les réactifs utilisés ne sont jamais complètement sélectifs vis-à-vis d'une forme particulière. En outre, dans des matrices aussi complexes que sont les sols, il est difficile de garantir la sélectivité des extractants et les métaux libérés suite à la dissolution des phases porteuses peuvent se réadsorber sur d'autres constituants, ou précipiter dans des phases néoformées (Ostergren et al., 1999; La Force and Fendorf, 2000; Calmano et al., 2001). Par conséquent, l'approche chimique ne permet pas une identification précise des phases métallifères dans une matrice donnée.

Dans ce travail, la spéciation des métaux a été étudiée avec une approche moléculaire par l'utilisation conjointe des techniques physiques de caractérisation sur la source synchrotron, comme la micro-fluorescence X (μSXRF), la micro-diffraction X (μXRD), et la spectroscopie EXAFS (EXAFS et μEXAFS) associée au traitement statistique des données. Cette approche permet d'acquérir une connaissance quasi complète de l'ensemble des phases solides porteuses des métaux en dépit du caractère hétérogène et polyphasique du sol. La démarche analytique employée et les spécificités des techniques sont détaillées ci-dessous.

II.4.1. Localisation des métaux par micro-fluorescence X sur rayonnement synchrotron (μSXRF)

La localisation des métaux et la détermination de leurs associations géochimiques dans la matrice du sol, hétérogène même à l'échelle de quelques micromètres, constitue la première étape d'analyse. Pour cela, des cartographies élémentaires de fluorescence X ont été réalisées par μSXRF (micro-Synchrotron-based X-Ray Fluorescence) sur des lames minces du sol non perturbé, sur la ligne de lumière 10.3.2 à l'Advanced Light Source (ALS)

de Berkeley. Cette technique consiste à mesurer le rayonnement de fluorescence X avec une résolution latérale du faisceau X de l'ordre de quelques μm^2 , permettant de sonder un volume réduit (quelques μm^3) de l'échantillon. De plus, la grande intensité du faisceau X issu du rayonnement synchrotron permet d'atteindre une sensibilité de détection de l'ordre de quelques $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour les métaux de transition. Ainsi, les cartes de répartition des éléments obtenues par μSXRF permettent de localiser les éléments au sein de la matrice du sol, de déterminer les corrélations inter-éléments et leur fractionnement entre les phases porteuses.

II.4.2. Identification des phases porteuses par micro-diffraction X (μXRD)

Une fois les métaux localisés, l'étape suivante consiste à identifier la nature et la structure des phases porteuses par micro-diffraction des rayons X (μXRD). Dans son utilisation conventionnelle, la diffraction de rayons X permet d'effectuer l'analyse minéralogique globale avec identification des espèces cristallines majeures. En revanche, cette technique n'est pas ou peu sensible aux espèces minérales minoritaires et mal cristallisées (oxydes de fer, de manganèse, argiles, etc.) susceptibles de contenir les métaux. La solution consiste à utiliser un micro-faisceau X afin d'enregistrer les micro-diffractogrammes X des grains métallifères précédemment identifiés par μSXRF . Autrement dit, le couplage $\mu\text{SXRF}/\mu\text{XRD}$ permet à la fois d'accéder à la nature minéralogique des constituants minéraux présents dans la matrice, même si ceux-ci sont minoritaires, ainsi qu'à leur composition chimique. Les analyses de μXRD ont été effectuées également sur la ligne de lumière 10.3.2. de l'ALS de Berkeley.

II.4.3. Identification et quantification des espèces chimiques par spectroscopie EXAFS et micro-EXAFS (μEXAFS)

Les mesures d'EXAFS dans le cadre de ce travail ont été effectuées sur la ligne FAME à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble. Les expériences de μEXAFS ont été menées sur la ligne 10.3.2. à l'ALS de Berkeley. Les informations techniques sur la spectroscopie EXAFS ainsi que sur la méthode d'extraction et de traitement des spectres EXAFS sont reportées en Annexe.

La spectroscopie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) est basée sur l'absorption des rayons X par un atome cible présent dans un échantillon. Cette technique sonde l'environnement chimique et structural de cet atome autour 3-4 Å. Le signal obtenu est

principalement fonction de la nature des atomes voisins de l'atome cible, de leur nombre et de leur distance de l'atome cible. L'EXAFS permet donc d'accéder spécifiquement à l'environnement chimique et structural d'un élément cible au sein d'une matrice, indépendamment de sa composition chimique et minéralogique. Il s'agit d'un signal moyenné sur toutes les formes de l'élément cible présentes dans le volume analysé d'échantillon. L'amplitude et la forme d'un spectre EXAFS sont caractéristiques d'un type d'environnement donné, un peu à la manière des diffractogrammes de rayons X qui sont utilisés pour identifier les structures cristallines organiques et inorganiques.

La spectroscopie EXAFS présente de nombreux atouts pour l'étude de la spéciation des métaux dans les sols et les sédiments : (i) elle est chimiquement sélective, et peut être utilisée au seuil d'absorption K, L ou M d'un élément ; (ii) sa sensibilité à l'ordre local rend possible l'étude des composés mal cristallisés et amorphes, des cations adsorbés sur des surfaces minérales ou complexés avec la matière organique ; (iii) sa limite de détection est relativement basse puisqu'elle peut atteindre jusqu'à quelques centaines de $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en mode de fluorescence. Cette limite n'est pas absolue et dépend essentiellement du flux de la source du rayonnement X, du taux de comptage et de la résolution en énergie du détecteur de fluorescence, de l'élément analysé et de la nature chimique de la matrice.

La principale limite de l'EXAFS est inhérente à la nature des échantillons naturels. En effet, les sols et les sédiments sont des milieux hétérogènes où un élément est généralement présent sous plusieurs formes (systèmes multi-phases). Puisque le signal EXAFS représente une somme pondérée des contributions de chaque espèce métallique présente dans le volume analysé, les signaux des espèces minoritaires peuvent être masqués par les signaux des espèces majoritaires. Ce phénomène peut être accentué si dans ces espèces minoritaires, l'élément étudié est associé à des atomes légers. En effet, la sensibilité de l'EXAFS vis-à-vis des éléments légers est moindre, car le pouvoir de rétrodiffusion des atomes est fonction de leur numéro atomique.

Le manque de sensibilité de l'EXAFS vis-à-vis des espèces minoritaires peut être levé par différentes approches : (i) en utilisant des traitements physiques et/ou chimiques pour dissoudre certaines phases et d'en concentrer d'autres (Manceau et al., 1996; Ostergren et al., 1999; Juillot et al., 2003); (ii) en appliquant un traitement statistique, l'Analyse en Composantes Principales (ACP) à un ensemble de spectres EXAFS (Wasserman, 1997; Wasserman et al., 1999; Ressler et al., 2000; Manceau et al., 2002b); (iii) en utilisant la technique de l'EXAFS avec un faisceau X latéralement résolu sur quelques μm^2 , ou micro-EXAFS (μEXAFS) (Manceau et al., 2002b).

C'est cette dernière approche, de μEXAFS couplée à l'ACP et à l'EXAFS conventionnelle (non résolue latéralement), qui a été appliquée dans ce travail. La technique de μEXAFS avec l'utilisation d'un micro-faisceau X a été mise en œuvre sur les lames

minces de sol pour identifier individuellement les formes des métaux dans chacune des associations géochimiques préalablement identifiées par μ SXRF. Grâce au micro-faisceau, l'information sur l'environnement local de l'élément cible est moyennée sur un volume de quelques μm^3 , ce qui accroît la probabilité d'isoler le signal EXAFS des espèces individuelles, et de les identifier directement en comparant leurs spectres EXAFS avec les spectres des composés de référence. Dans le cas où un mélange d'espèces persiste encore à cette échelle, ce qui est souvent le cas dans les sols, les espèces peuvent être identifiées de façon indirecte par l'enregistrement d'un grand nombre de spectres μ EXAFS, avec des proportions variables des espèces, suivi de l'ACP. Ce traitement statistique est d'autant plus efficace que le nombre de spectres est grand, et surtout que l'ensemble de spectres reflète la variabilité des espèces présentes dans la matrice analysée. A partir de l'ensemble de spectres μ EXAFS, l'ACP permet de déterminer le nombre de composantes principales nécessaire et suffisant pour reconstruire tous les spectres de l'ensemble. Ce nombre correspond au nombre d'espèces présentes significativement dans l'échantillon analysé. Lorsque le nombre d'espèces est déterminé, il est possible d'identifier la nature d'espèces en reconstituant les spectres des composés de référence à partir des composantes principales. Si le spectre d'un composé de référence est correctement reconstitué à partir des composantes principales, ce composé fait partie des espèces présentes dans l'échantillon.

Une fois que le nombre et la nature des espèces individuelles sont identifiés par μ EXAFS et l'ACP, leurs proportions dans le volume du sol peuvent être quantifiées par simulation du spectre EXAFS sur poudre du sol par combinaison linéaire des spectres des composés de référence en utilisant la méthode des moindres carrés. En effet, la spectroscopie EXAFS non résolue latéralement appliquée à l'échantillon moyen du sol brut broyé sous forme de poudre nous renseigne sur la spéciation moyenne de l'élément cible dans le volume de sol, puisque c'est la somme des spectres individuels de chacune des espèces préalablement identifiées par μ EXAFS pondérée par la proportion de chacune des espèces dans le volume de sol. Dans cette méthode, la précision sur la proportion d'une espèce est estimée à environ $\pm 10\%$ de la quantité totale de l'élément analysé (Manceau et al., 2000a; Isaure et al., 2002). Cette valeur peut être plus importante lorsque l'échantillon est très concentré en élément cible, auquel cas des phénomènes de self-absorption (ou over-absorption) se produisent (Manceau et al., 2002b). Ainsi, avec cette méthode, le pourcentage total des espèces ne représente pas généralement 100 %.

CHAPITRE III. Spéciation des métaux dans le sol initial & Solubilité des métaux *in vitro* avec des chélatants

Ce chapitre englobe la caractérisation du sol à l'état initial avant phytoremédiation, l'étude de la spéciation du zinc dans ce sol, ainsi que l'étude au laboratoire de la solubilité de Zn, Pb et Cu avec des chélatants organiques (citrate, EDTA et EDDS).

Ces études ont fait l'objet d'un article intitulé "Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling", paru dans Geochimica et Cosmochimica Acta.

***Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 (2006) 2163–2190**

Article :

**Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil
using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical
extraction, and thermodynamic modeling**

paru dans *Geochimica et Cosmochimica Acta*

Tatiana A. Kirpichtchikova ^{a,c}, Alain Manceau ^a, Lorenzo Spadini ^a, Frédéric Panfili ^a,
Matthew A. Marcus ^b, Thierry Jacquet ^c

^a Environmental Geochemistry Group, LGIT, Université J. Fourier and CNRS, BP 53, 38041
Grenoble Cedex 9, France

^b Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA

^c Phytorestore-Site et Concept, Hôtel Vigée Le Brun, 8 rue du Sentier, 75002 Paris, France

Received 16 May 2005; accepted in revised form 13 February 2006

ABSTRACT

Synchrotron-based X-ray radiation microfluorescence (μ -SXRF) and micro-focused and powder extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy measurements, combined with desorption experiments and thermodynamic calculations, were used to evaluate the solubility of metal contaminants (Zn, Cu, Pb) and determine the nature and fractional amount of Zn species in a near-neutral pH (6.5-7.0) truck-farming soil contaminated by sewage irrigation for one hundred years. Zn is the most abundant metal contaminant in the soil (1103 mg/kg), followed by Pb (535 mg/kg) and Cu (290 mg/kg). The extractability of Zn, Pb, and Cu with citrate, S,S-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was measured as a function of time (24 h, 72 h, 144 h), and also as a function of the number of applications of the chelant (5 applications each with 24 h of contact time). Fifty-three percent of the Zn was extracted after 144 h with citrate, 51% with EDDS and 46% with EDTA, compared to 69, 87, and 61% for Cu, and 24, 40, and 34% for Pb. Renewing the extracting solution removed more of the metals. Seventy-nine, 65, and 57% of the Zn was removed after five cycles with citrate, EDDS and EDTA, respectively, compared to 88, 100, and 72% for Cu, and 91, 65, and 47% for Pb. Application to the untreated soil of μ -SXRF, laterally resolved μ -EXAFS combined with principal component analysis, and bulk averaging powder EXAFS with linear least-squares combination fit of the data, identified five Zn species: Zn-sorbed ferrihydrite, Zn phosphate, Zn-containing trioctahedral phyllosilicate (modeled by the Zn kerolite, $\text{Si}_4(\text{Mg}_{1.65}\text{Zn}_{1.35})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), willemite (Zn_2SiO_4), and gahnite (ZnAl_2O_4), in proportions of ~30, 28, 24, 11, and less than 10%, respectively (precision: 10% of total Zn). In contrast to Cu and Pb, the same fractional amount of Zn was extracted after 24 h contact time with the three chelants (40-43% of the initial content), suggesting that one of the three predominant Zn species was highly soluble under the extraction conditions. Comparison of EXAFS data before and after chemical treatment revealed that the Zn phosphate component was entirely and selectively dissolved in the first 24 h of contact time. Preferential dissolution of the Zn phosphate component is supported by thermodynamic calculations. Despite the long-term contamination of this soil, about 79% of Zn, 91% of Pb, and 100% of Cu can be solubilized in the laboratory on a time scale of a few days by chemical complexants. According to metal speciation results and thermodynamic calculations, the lower extraction level measured for Zn is due to the Zn phyllosilicate component, which is less soluble than Zn phosphate and Zn ferrihydrite.

1. Introduction

Soils are the major sink for metal contaminants released into the environment by anthropogenic activities. Unlike many organic contaminants, heavy metals cannot be destroyed by biogeochemical processes, and site restoration relies on their removal. Various in situ and ex situ soil cleanup technologies have been employed, of which the most common are incineration, disposal in landfill, flotation, electroremediation, bioleaching, phytoremediation, and soil washing with chemicals (Van Benschoten et al., 1997; Peters, 1999; Mulligan et al., 2001; Vandevivere et al., 2001a). Incineration and landfill, which account today for a large proportion of soil cleanup operations, may lose economic interest and public acceptance in the future because they are not environmentally acceptable when large volumes are to be treated. They are also incompatible with sustainable development precepts, since the soil resource is irretrievably lost. Electroremediation and flotation are generally used to treat clayey and organic soils of low permeability (Acar and Gale, 1995; Mulligan et al., 2001). Bioleaching and phytoremediation are emerging technologies, which have low implementation costs and significant environmental benefits, but the treatment time (i.e., typically several years) is a major obstacle to gaining commercial significance (Blais et al., 1992; Cunningham and Berti, 1993; Blaylock et al., 1997; McGrath, 1998; Salt et al., 1998; Tichy et al., 1998). Soil washing is usually performed ex situ in reactors with strong mineral acids and bases, and is efficient in terms of metal solubilization. However, soil fertility cannot be recovered when aggressive chemical treatments are employed because the original soil texture and biogeochemistry are destroyed irreversibly, leaving essentially an inorganic matrix that will not support revegetation (Peters, 1999).

Chelating agents having a high affinity for heavy metals, such as EDTA, CDTA, DTPA, EDDHA, EGTA, HEDTA, and NTA, are alternatives to acid–base soil washing, and can be used as a curative chemical treatment or in adjunct to another process (Peters, 1999). Chelants foster the desorption of sorbed and occluded species and the dissolution of precipitated forms until equilibrium is reached (Norvell, 1984). The amount of metal solubilized with chelating agents is at least as high as with more aggressive chemical compounds, with less undesired effects on the soil physico-chemical properties (Elliott and Brown, 1989; Cline and Reed, 1995; Ghestem and Bermond, 1998; Steele and Pichtel, 1998). Also, chelants may be used to increase the bioavailability and bioaccumulation of metals by increasing their concentration in the soil solution. Various metals and radionuclides have been targeted for chelate-enhanced phytoremediation, including Pb (Blaylock et al., 1997; Huang et al., 1997; Vassil et al., 1998; Cooper et al., 1999; Wu et al., 1999), Zn (Blaylock et al., 1997; Ebbs et al., 1997; Ebbs and Kochian, 1998; Kayser et al., 2000), Cu (Blaylock et al., 1997; Kayser et al., 2000; Thayalakumaran et al., 2003a,b,c), Cd (Blaylock et

al., 1997; Ebbs et al., 1997; Kayser et al., 2000; Robinson et al., 2000), Ni, Co (Blaylock et al., 1997; Robinson et al., 1999), U (Ebbs et al., 1998; Huang et al., 1998), and Au (Anderson et al., 1998). As of today, the best results were obtained on Pb-contaminated soils using Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in combination with EDTA (Blaylock, 2000). Soils contaminated by Cu and Zn are more difficult to treat with this technique, because these elements are more bioavailable than Pb (Lombi et al., 2001), and their presence prevents the establishment of a high-biomass crop before the application of the chelant.

Although many chelating compounds for mobilizing heavy metals have been evaluated, there remain uncertainties as to the optimal choice for full-scale application. There are many factors to consider, including extraction efficiency, potential adverse effects on living organisms, and degradability and cost of the chelating compound. In addition, one generic molecule may not exist because metal extractability by a given chelant depends on the physicochemical properties of the soil and the molecular forms of the target metal. The molecule best suited for a certain matrix may be the worst suited for another. Time is also an issue. The short-term solubilization of metals is dominated by the most labile species, while the long-term removal is determined by the replenishment of the labile pool from more recalcitrant species. Therefore, the identification and quantification of coexisting solid metal species in the soil before and after treatment are essential to design and assess the efficiency of appropriate remediation technologies.

Metal speciation in soils has been investigated with sequential extraction procedures. In principle, this approach allows the identification and quantification of as many metal forms as there are extraction steps using chemical reagents of different binding strengths and metal-specificity. Usually, metal forms are classified into five fractions: exchangeable, carbonate, Fe-Mn oxides, organic, and residual fractions (Tessier et al., 1979). However, this approach has many pitfalls, including the dissolution of non-target phases (Ostergren et al., 1999), the incomplete dissolution of a target phase (La Force and Fendorf, 2000), the incomplete removal of dissolved species due to readsorption or reprecipitation (Ostergren et al., 1999; Calmano et al., 2001; Scheinost et al., 2002), and the possible modification of the original oxidation state of the metal or metalloid (Gruebel et al., 1988). Therefore, metal forms determined by chemical extractions are operationally defined, and they may, or may not, reflect the exact nature of the existing species. This approach also provides no information on the crystal chemical status of the metal contaminant. As useful and as often used as these “operational speciation” methods are, there is a clear need for a robust method to reliably identify and quantify the metal species at the molecular scale in solid matrices.

Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy is well suited to investigate metal speciation in soils, sediments, and biological matter because of its element

selectivity, sensitivity to the binding environment of the probed element (here Zn), detection limit as low as about 100 mg/kg for most heavy metals, no need for vacuum sample environment for elements whose atomic number is higher than about 20 (i.e., Ca), and minimal sample preparation (Cotter-Howells et al., 1994, 1999; Manceau et al., 1996, 2000a, 2002a, 2003, 2004, 2005; O'Day et al., 1998, 2000; Foster et al., 1998; Sarret et al., 1998, 2001, 2002, 2004; Ostergren et al., 1999; Morin et al., 1999, 2001; Savage et al., 2000; Gaillard et al., 2001; Hansel et al., 2001; Ryan et al., 2001; Strawn et al., 2002; Scheinost et al., 2002; Isaure et al., 2002, 2005; Kneebone et al., 2002; Roberts et al., 2002; Kim et al., 2003; Juillot et al., 2003; Paktunc et al., 2003, 2004; Nachtegaal et al., 2005; Panfili et al., 2005; Voegelin et al., 2005). The measured EXAFS signal is averaged over all local chemical and structural environments of the target element in the analyzed volume, which can be problematic when the metal is present in several forms (Manceau et al., 1996). Fortunately, due to the heterogeneous distribution of minerals, detrital organic matter, and living organisms in soils, the nature and proportions of metal species vary on millimeter to micron length scales, affording a means to untangle the composite EXAFS signal into single-species component spectra. Suffice it then to use an X-ray probe whose lateral dimension is commensurate with this scale of heterogeneity, as are those available at 3rd generation synchrotron facilities (Sutton et al., 1999, 2002; Manceau et al., 2002b). It is important to realize that the actual chemical and structural resolution of a microprobe is higher than its spatial resolution because sub-micrometer heterogeneities make the sample inhomogeneous at the scale of analysis. Heterogeneities at a scale larger than the resolution of the microprobe can be resolved by comparing the species obtained from the microanalyses to those detected in EXAFS spectroscopic analyses of the bulk sample. However, correct identification and quantification of all species at the macroscale relies on adequate statistical sampling at the field site.

Chemically distinct microenvironments are imaged first with synchrotron-based X-ray micro-fluorescence (μ -SXRF) to characterize elemental distributions and target points-of-interest (POIs) that differ in co-association of elements for subsequent μ -EXAFS analysis. If the incident X-ray beam has dimensions of a few tens of square micrometers, then the analyzed soil area generally contains one, and rarely more than three species, thereby increasing the probability of recording single-component EXAFS spectra (i.e., from pure species), or allowing the collection of a series of distinct multi-component spectra (i.e., from mixtures) at POIs. When more spectra than unknown species are collected, and the species proportions are sufficiently different both within and among the spectra, the number of components (species) in the system can be determined by principal component analysis (PCA). Target transformation is used to determine if a given standard spectrum is one of the components (Wasserman, 1997; Wasserman et al., 1999; Ressler et al., 2000; Manceau et

al., 2002b). The proportion of each species is assessed by recording the EXAFS spectrum of several cubic millimeters from the powdered soil sample with a low spatial resolution X-ray beam (Manceau et al., 1996). Because the powder EXAFS spectrum is a weighted sum of all species spectra present in the bulk, the atomic fraction of each metal species can be obtained by linear combination fits (LCF) of this spectrum to reference spectra previously identified by PCA.

These microscopic and bulk-averaging synchrotron radiation tools have been successfully used to characterize Ni and Zn in natural (Manceau et al., 2002a, 2003, 2004, 2005; Marcus et al., 2004) and contaminated surface and subsurface soils and sediments (Manceau et al., 2000a; Roberts et al., 2002; Isaure et al., 2002, 2005; Sarret et al., 2004; Voegelin et al., 2005; Nachtegaal et al., 2005). Here, we use this approach to determine the structural forms of Zn in the solid fraction of a soil previously used for truck farming and irrigated by sewage water for 100 years. The soil is also contaminated by Pb and Cu, and to a lesser extent by other metals and metalloids. As a result of the polymetallic and aged nature of the pollution, this soil is scientifically and technically challenging for speciation study and remediation treatment. Zn, Pb and Cu extractability were investigated first with batch extraction experiments using three chelating agents, one natural carboxylic acid, citrate, and two synthetic aminocarboxylic acids, S,S-ethylenediaminedisuccinic acid (S,S-EDDS, hereafter referred to as EDDS), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Citrate is an easily biodegradable complexant that is exudated in the rhizosphere of many vascular plants for their nutrition (Hinsinger, 2001). EDDS is a synthetic structural S,S-isomer of EDTA which is also readily biodegradable and has been proposed as a safe and environmentally benign substitute for EDTA in soil washing (Vandevivere et al., 2001a,b; Tandy et al., 2004) and chelate-enhanced phytoremediation (Grcman et al., 2003). EDTA, the most widely studied chelating agent, was used as a reference to evaluate the efficiency of the two other chelants. The nature of dissolved and residual Zn species after the chelant treatments were determined by comparing laterally resolved (μ -EXAFS) and powder EXAFS spectra of the soil before and after chemical extraction. Results were used to formulate a phytoremediation treatment that was tested in a pilot-scale experiment, which will be reported on in a subsequent paper.

2. Materials and methods

2.1. Site description and soil samples

The studied soil comes from the Pierrelaye plain, a 1200 ha truck farming area located about 30 km northwest of Paris (France), in the heart of an urban and industrial

suburb. From 1899 to 1999, this site was irrigated abundantly with untreated sewage water from the city of Paris. As a result, the entire area is now contaminated by a cocktail of heavy metals, dominated by Zn, Pb and Cu. The metal contamination is confined essentially to the ploughed layer (i.e., down to ~60 cm below the surface), and the metal content is highly variable at the hectometer, and sometimes decameter, scale. Typical concentrations of Zn range from 150 to 3150 mg/kg, of Pb 80 to 668 mg/kg, and of Cu 50 to 390 mg/kg (Baize et al., 2002). The compositional variation is due to the variability of water flow paths relative to the geometry of the irrigation network. Within each field, the gradient of metal concentration goes downslope from irrigation outlets and generally follows the ploughing direction, with higher metal contents mostly observed at lower elevation. A survey in 1996-1998 of the entire irrigated area revealed high heavy metal contents in vegetables, and prompted the authorities to forbid truck farming in 1999. Since then, grain corn is the only authorized crop.

An undisturbed block of about 150 cm² horizontal × 5 cm vertical was collected in the ploughed layer from an irrigated field. One part of the block was freeze-dried, impregnated with epoxy resin, and prepared as a 30 µm-thick micro-polished thin section for electron and X-ray microanalyses. Another part was freeze-dried, homogenized, and dry-sieved at 2 mm for chemical analyses, particle-size fractionation, and chemical treatments. The soil was separated into sand (2000-50 µm), silt (50-2 µm) and clay (<2 µm) size fractions. The sand and silt fractions were separated by wet sieving, and the clay fraction was isolated by sedimentation according to Stokes law. Chemical analyses of the bulk and size fractions were conducted on aqua regia digested samples by Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES, Jobin-Yvon JY 70) for major elements and Inductively Coupled Plasma–Mass Spectroscopy (ICP-MS, Perkin Elmer 5000) for trace elements, at the Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CNRS, Nancy, France). The bulk mineralogy was investigated by powder X-ray diffraction (XRD) using a Siemens D501 diffractometer with Co K α radiation. Homogeneous bulk samples of the untreated soil and of the residuals after the chemical treatments described below were pressed as pellets for powder EXAFS measurements.

2.2. Chemical extraction experiments

Desorption measurements were carried out in single extraction experiments with citrate, EDDS, and EDTA according to the conditions given in Table 1. Citrate was applied as a buffer solution made from free citric acid and NaOH at pH 5.5. EDTA was used as a di-sodium salt of EDTA, and EDDS as a tri-sodium salt of EDDS. One gram (dry weight) of the <2 mm soil fraction was placed in Nalgene centrifuge tubes, in which 5 mL of 10⁻² mol/L EDTA or EDDS, or 12.5 mL of 0.1 mol/L citrate, were poured. The initial soil pH was 6.5-7.0,

and was not adjusted after adding the extractant. No attempt was made to inhibit possible microbial degradation. Since citrate, EDTA, and EDDS usually form 1:1 complexes with most heavy metals, including Zn, Cu and Pb (Francis et al., 1992; Whitburn et al., 1999; Oviedo and Rodriguez, 2003), the theoretical minimum amount of chelating agent needed to extract the three metals is equal to the sum of their molar concentrations. In practice, the chelating agent is often applied in several-fold excess to maximize metal extraction (Linn and Elliott, 1988; Wasay et al., 1998; Vandevivere et al., 2001a). EDTA and EDDS form strong complexes with heavy metals, as indicated by the high value of their metal-binding stability constants ($12.7 \leq \log K \leq 18.78$), and they also have a marked affinity for heavy metals as indicated by their high selectivity coefficient ($\log SR = 18$) relative to Ca and Fe(III), the two main competing background cations present in the soil (Table 2). Consequently, a 1.4 molar excess relative to the sum of Zn, Cu, and Pb was considered sufficient to solubilise as much as possible of these metals (Table 1). Citrate is a weaker complexant than EDDS and EDTA ($4.08 \leq \log K \leq 5.9$), and it has a lower selectivity for heavy metals, suggesting a potential interference with Ca and Fe extraction, (Table 2). For this reason, the amount of added citrate equaled 1.4 times the sum of Zn, Cu, Pb, Ca and Fe (Table 1).

Table 1. Chemical extraction procedures.

Extracting solution		Molar ratio chelant/sum of elements	Sample name for EXAFS
Untreated soil			x 0
Citrate	0.1 M $C_6H_8O_7$ + 0.1 M NaOH (pH 5.5) ^a	1.4 ^d	x Ci
EDDS	0.01 M Na_3HEDDS ^b	1.4 ^e	x EDDS
EDTA	0.01 M Na_2H_2EDTA ^c	1.4 ^e	x EDTA

^a Procedure adopted from Wasay et al. (1998), and Bassi et al. (2000).

^b Procedure adopted from Vandevivere et al. (2001a).

^c Procedure adopted from Sun et al. (2001).

^d Molar ratio corresponded to $[chelant]/[Zn+Cu+Pb+Fe+Ca]$.

^e Molar ratio corresponded to $[chelant]/[Zn+Cu+Pb]$.

Two series of metal extraction were performed. In the first, the extraction time was fixed at either 24 h, 72 h or 144 h and each extraction was performed on a separate soil sample. In the second series, five successive extractions of the same sample, each lasting 24 h, were performed by renewing the extracting solution at the start of each time interval. All extractions were carried out at room temperature, with shaking at 350 rpm, and in duplicate.

The pH of the suspension was measured at the beginning and at the end of each extraction step. All supernatants were centrifuged for 15 min at 3000 rpm and filtered through 0.45 μm filters for chemical analysis by ICP-AES. The residues from centrifugation at the end of the extraction experiments were washed with 30 mL distilled-deionized water, the solids freeze-dried for EXAFS analysis, and the wash solutions discarded. The extracted metal fraction was calculated as the ratio of the amount of metal in the supernatant to the amount initially present in the soil sample.

Table 2. Stability constants of metal-ligand complexes.

	log K Ca	log K Fe(III)	log K Cu	log K Zn	log K Pb	Selectivity ratio ^a (log value)
Citrate ^b	3.50	11.50	5.90	4.98	4.08	0
EDDS ^c	4.72	22.00	18.50	13.40	12.70	18
EDTA ^c	10.81	25.10	18.78	16.50	18.00	18

^a The selectivity ratio (SR) is defined as the ratio of the solubility of heavy metals (e.g. Zn, Cu, Pb) to that of background cations (e.g. Fe, Ca) for a given set of metal and chelant concentrations in the system (Peters, 1999). It is calculated as $[\text{ZnL} + \text{CuL} + \text{PbL}] / [\text{FeL} + \text{CaL}]$. A high SR value indicates a strong preference of the chelant for heavy metals.

^b log K values of the equilibrium $\text{M} + \text{L} = \text{ML}$ (where L is fully deprotonated) at 20°/25°C, for 0.1 M ionic strength from Smith and Martell (1989).

^c log K values of the equilibrium $\text{M} + \text{L} = \text{ML}$ (where L is fully deprotonated) at 20°/25°C, for 0.1 M ionic strength from Martell et al. (2001).

2.3. Electron and X-ray microanalyses (SEM-EDS and μ -SXRF)

Electron probe point microanalyses were performed on two soil thin sections at the Laboratoire de Cristallographie (CNRS, Grenoble, France) with a JEOL JSM-840 A scanning electron microscope (SEM) equipped with an energy dispersive spectrometer (EDS) allowing the detection of elements with $Z \geq 6$. The POIs were relocated by μ -SXRF on beamline 10.3.2 at the Advanced Light Source (ALS, Berkeley, USA), and the distribution and associations of high Z elements ($Z \geq 18$) in regions containing the POIs were imaged by elemental mapping at 13.1 keV. The analyzed regions were scanned with 20 μm steps and a 16 (H) \times 7 (V) μm^2 (FWHM) beam size for large overview maps, and 5 μm steps and 5 (H) \times 5 (V) μm^2 beam size for detailed maps. The fluorescence-yield intensity was measured using a 7-element Ge solid-state detector and normalized by the incident beam intensity (I_0) and

the count time. Details of the beamline and X-ray fluorescence data treatments can be found in Manceau et al. (2002b) and Marcus et al. (2004).

2.4. Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy (EXAFS)

The chemical forms of Zn and their proportions in the soil were determined by EXAFS spectroscopy applied at micrometer (μ -EXAFS) and macroscopic (EXAFS) scales of resolution. Fluorescence-yield Zn K-edge μ -EXAFS spectra were recorded on beamline 10.3.2 on selected POIs of the thin sections, chosen on the basis of elemental associations identified by μ -SXRF. The size of the beam was adjusted to match the sample heterogeneity at the analyzed spot. Fluorescence-yield Zn K-edge bulk EXAFS spectra of the pellet samples were recorded on the FAME beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) using a Canberra 30-element Ge solid-state detector and a 300 (H) \times 100 (V) μm^2 (FWHM) focused beam. For all X-ray analyses, the sample was oriented to 45° from both the incident and detected X-ray beam.

2.5. EXAFS data analysis

The μ -EXAFS and powder EXAFS spectra were extracted from raw X-ray absorption spectra and normalized using standard methods (Teo, 1986). The k^3 -weighted EXAFS spectra were analyzed by combining PCA with LCF of reference spectra to experimental data according to the procedure described in Manceau et al. (2002b). For this approach, an extensive database, which is a compilation of the many Zn reference compounds (both synthetic and natural) previously acquired by our team, was used (Sarret et al., 1998; Manceau et al., 2000a, 2002c, 2004, 2005; Schlegel et al., 2001a; Isaure et al., 2005; Panfili et al., 2005). This database includes primary Zn minerals (carbonate, gahnite, sphalerite, willemite, zincite, zincochromite, etc.), secondary Zn minerals, Zn sorption complexes and precipitates (hydroxyapatite, hopeite, phosphate dihydrate, goethite, ferrihydrite, hematite, kerolite, montmorillonite, birnessite, etc.), and Zn organic complexes (low-molecular-weight organic acids, humic and fulvic acids, bacterial exopolymers, and fungi cell walls).

Applying PCA to the complete set of μ -EXAFS spectra collected at different POIs, it was generally possible to estimate the number of species contained in the sample without a priori knowledge of their identity. This number was estimated first using the indicator parameter, IND, which ideally reaches a minimum between primary components (i.e., combination of chemical species spectra) and secondary components (i.e., background signal) (for details, see Malinowski, 1991, and Manceau et al., 2002b). Previous studies showed that this parameter may underestimate (Manceau et al., 2002b; Panfili et al., 2005),

or overestimate (Sarret et al., 2004), the real number of species. Consequently, the number of significant component species was evaluated by comparing the marginal improvement of the fit total (normalized sum-square total, Sarret et al., 2004) by successively including the next principal component to the reconstruction of the data. In addition, we verified that all selected principal components were EXAFS-like. The nature of Zn species was determined by target transformation, an operation that tests the suitability of each candidate species for inclusion in the spectral data set. The closer the transformed to the original spectrum, the most likely is the Zn species present in the sample. Finally, the nature and proportions of Zn species contained in each analyzed sample volume (i.e., POIs of the thin sections and powdered samples) were determined by LCF of the corresponding experimental EXAFS spectra to the identified Zn species EXAFS spectra. Best fits were derived by increasing incrementally the number of spectral components, and by optimizing the fraction of each component with each increment. The best statistical solution was obtained when the fit residual parameter (R) was minimized

$$R = \frac{1}{n-m} \sum_{k=1}^n \left(k^3 \chi_{exp}(k) - k^3 \chi_{model}(k) \right)^2, \quad (1)$$

where n is the number of data points in the fit interval, and m is the number of components (i.e., reference spectra) included in the fit. The fit interval varied between 2.5-10.5 and 2.5-11.5 Å⁻¹, depending on the data quality. The uncertainty in the proportion of Zn species is estimated to be approximately 10% of the total amount of Zn (Manceau et al., 2000a, 2002b; Isaure et al., 2002). Thus, species whose fractional amount is less than ~10% should be viewed with caution.

3. Results

3.1. Chemical and mineralogical characterization

The soil has a near-neutral pH (6.5-7.0) and a sandy loam texture. The 0-40-60 cm upper layer is black and rich in humus, and the lower layer down to 80 cm is reddish and clayey. Optical microscopic observation of the soil thin sections with natural and polarized light showed heterogeneous morphological textures with the presence of grains (quartz, calcite, feldspars), coarse organic particles, finely dispersed clay matrix, and numerous anthropogenic materials (brick residues, charcoal, industrial scoria, etc.).

Chemical and mineralogical characteristics of the soil are reported in Table 3. The bulk soil chemistry is dominated by Si ([SiO₂] = 79.6%), followed by Ca ([CaO] = 3.4%), and

Al ($[Al_2O_3] = 2.5\%$). Iron comes in fourth position with a concentration ($[Fe_2O_3] = 2.0\%$) lower than the average concentration reported for French soils (3.6%) (Baize, 2000). The soil has unusually high organic carbon content ($[C_{org}] = 3.3\%$), in comparison to most sandy ploughed soils (0.7-1.0%) (Baize, 2000). Phosphorus content is also uncommonly elevated ($[P_2O_5] = 0.6\%$), in comparison to its average value in soils (0.05%) (Sutton et al., 1999). The higher amounts of C_{org} and P probably result from long-term fertilization and intensive crop production. The most abundant trace elements are Zn (1103 mg/kg), Pb (535 mg/kg), and Cu (290 mg/kg). These values are on the higher side of the concentration range measured in the whole irrigated area, and intermediate between those reported for nearby agricultural soils (34-63 mg/kg Zn, 18-43 mg/kg Pb, and 8-19 mg/kg (Cu) (Baize et al., 2002), and soils impacted by smelting activities (2746-21078 mg/kg for Zn, 406 mg/kg for Cu, and 8876-9135 mg/kg for Pb) (Thiry and Van Oort, 1999; Manceau et al., 2000a; Roberts et al., 2002; Juillot et al., 2003; Sarret et al., 2004). Consequently, the contamination of the studied soil can be regarded as moderate and diffuse.

Table 3. Chemical and mineralogical characteristics of the soil.

Particle size distribution (wt.%)		Element concentrations in the <2 mm soil fraction								
		(mg/kg)			(%)					
		Zn	Cu	Pb	SiO ₂	CaO	Al ₂ O ₃	K ₂ O	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅
		1103	290	535	79.6	3.4	2.5	0.6	2.0	0.6
Element distributions into soil size fractions ^a (wt.%)										
Sand (2000-50µm)	69	17	18	15	79	23	27	34	25	20
Silt (50-2µm)	23	41	47	43	18	55	44	49	39	41
Clay (<2 µm)	8	42	35	42	3	22	29	17	36	39

^a Mass distribution of elements in the soil size fractions calculated as $C_f \times M_f / C_{tot}$, where C_f is the element concentration in the fraction, M_f is the mass percentage of the fraction, and C_{tot} is the element concentration in the bulk soil.

The mineralogy of the bulk soil is dominated by quartz and calcite, mixed with minor amounts of albite, microcline, and phyllosilicate. No metal bearing phases were observed by XRD. The particle size distribution consists of 69% sand, 23% silt, and 8% clay in weight. Calculation of elemental distribution among soil size fractions shows that the silt and clay fractions are the main reservoirs of heavy metals. The silt fraction contains 41% of total Zn,

47% of total Cu, and 43% of total Pb. Although the clay fraction represents only 8% of the soil weight, it contains 42% Zn, 35% Cu, and 42% Pb.

3.2. Metal extractability

After 24 h of reaction time, the extractability of metals ranks in the order $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Pb}$ for the three chelating agents (Fig. 1). The higher extraction of Cu is consistent with the higher stability of Cu-ligand complexes for the three chelants, as indicated by $\log K$ values (Table 2). However, the relative stability of the three Cu-ligand complexes cannot explain the differences observed among chelants. For example, EDDS, whose complex with Cu is almost as strong as that with EDTA, extracted more Cu (73%) than EDTA (51%). Also, citrate extracted almost the same amount of Cu as EDTA (55 vs. 51%), although the two Cu complexes have a 13 order of magnitude difference in binding strength (Table 2). Similar discrepancies between stability constant values and metal extractability are observed for Zn. Despite the marked contrast in $\log K$ (Zn) values, which range over a factor of three, the three chelating agents extracted a similar proportion of Zn: 43% (citrate), 42% (EDDS), and 40% (EDTA) after 24 h. Likewise, the low extractability of Pb (32% with EDDS, 26% with EDTA, and 11% with citrate), compared to Cu and Zn, cannot be explained by $\log K$ (Pb) values because these are similar in value to those of Zn and Cu. This suggests that part of the Pb pool is more tightly bound to soil constituents than the other metals, possibly as pyromorphite or some other Pb-phosphate phases, given the low solubility of lead-containing phosphates, their reported occurrence in lead-impacted soils, and the exceptionally high amount of P in the soil (Cotter-Howells et al., 1994; Hettiarachchi et al., 2000; Buatier et al., 2001; Ryan et al., 2001). More generally, two reasons may be invoked for the lack of correlation between metal extractability and the affinity of the organic ligand for the metal as measured in pure solution: one is competitive binding of other cations (e.g., Fe, Ca) to the chelant, and the second is that heavy metals are bound unevenly to several constituents having different solubilities. These hypotheses were tested using equilibrium solubility calculations and are presented in Section 4.

Increasing the extraction time over 24 h increased the extracted amounts with a moderate dependence on the chelant and metal (Fig. 1). Metal extraction increased by 9% of the initial amount of metal for Cu, 6% for Zn, and 8% for Pb after 72 h of reaction time with EDTA, and levelled off after 144 h. With EDDS, the extraction increased by 7% for Cu, 3% for Zn, and 5% for Pb after 72 h, and then again by 7% for Cu, 6% for Zn, and 3% for Pb after 144 h. With citrate, the extraction of Cu, Zn, and Pb increased by 9, 6, and 6%, respectively, after 72 h, and again by 5, 4, and 7% after 144 h (the variation between the two replicates is <1%). Finally, the proportions of Cu, Zn, and Pb extracted after 144 h equaled 69, 53, and

24% with citrate, 87, 51, and 40% with EDDS, and 61, 46, and 34% with EDTA, respectively. In summary, increasing the reaction time from 24 to 144 h increased the extraction yields by only minor amounts.

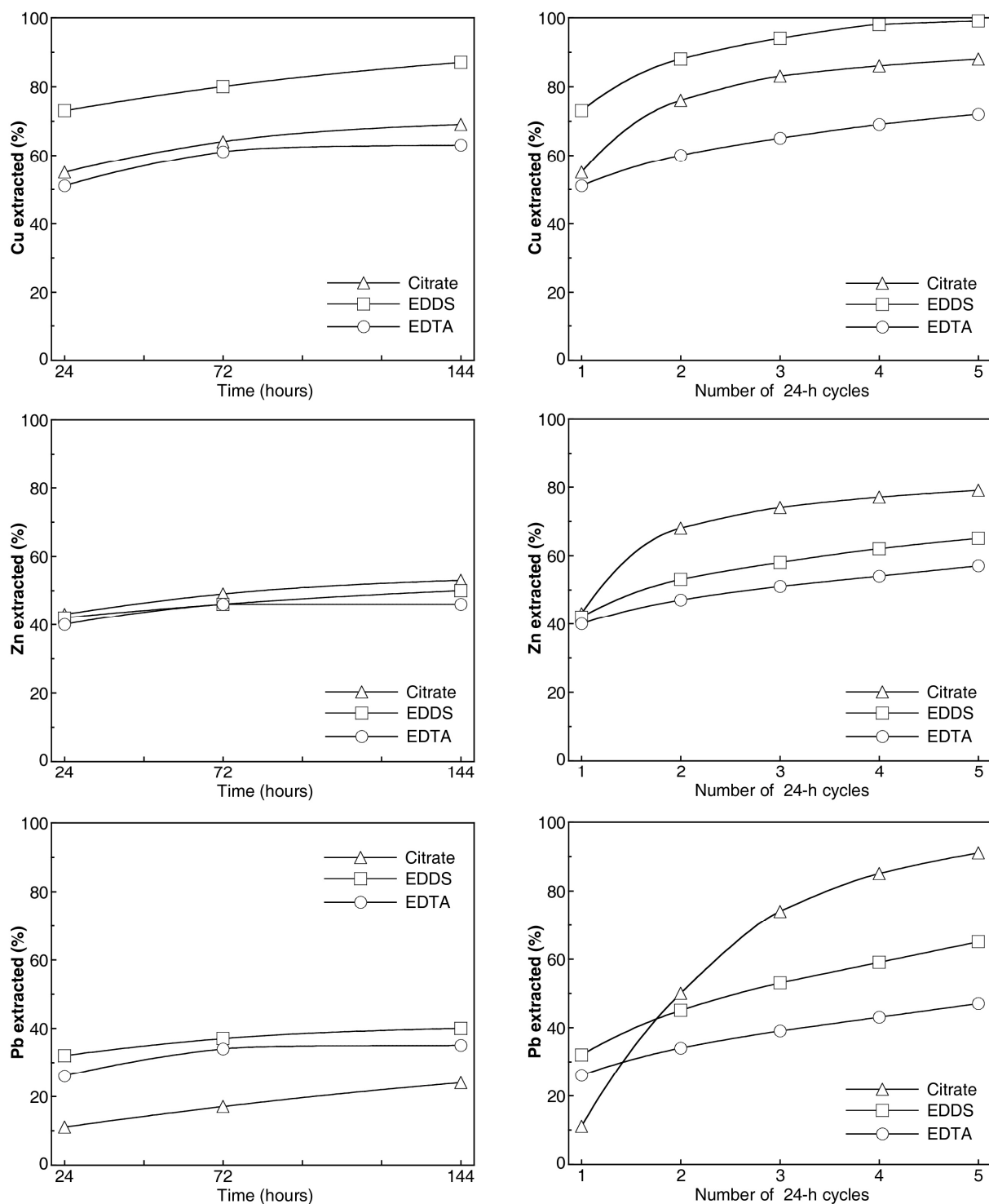


Fig. 1. Percentage of Zn, Cu and Pb solubilized by chemical extractions as a function of extraction time (left panel) and number of 24 h sequential extraction cycles (right panel). The deviations within duplicates are too small to be plotted as error bars (<1%).

Renewing the extracting solution greatly increased the dissolved metals, but not by the same amount for the three chelants: the solubilization curves had a logarithmic shape with citrate, and were almost linear with EDDS (with the exception of Cu) and EDTA (Fig. 1, Table 4). The proportions of Cu, Zn, and Pb removed from the soil after the five extraction cycles were, respectively, 88, 79, and 91% with citrate, 100, 65, and 65% with EDDS, and 72, 57, and 47% with EDTA. Renewing the citrate solution had a tremendous effect on Pb extraction since only 11% of Pb was extracted after the first cycle, while the second and third cycles solubilized 39 and 24% from the remaining amount of Pb after the first cycle, leading to a cumulative extraction of 91% after five cycles. The successive extraction of Zn and Cu from one cycle to another was lower than that of Pb, since the first cycle with citrate extracted 43% Zn and 55% Cu, the second 25% Zn and 21% Cu from the left over, the third 6% Zn and 7% Cu, and the last even less, as indicated by the logarithmic shape of the curves. These data, together with the fact that citrate, in combination with bicarbonate (i.e., citrate–bicarbonate reagent), is known to promote the dissolution of poorly crystalline Fe oxyhydroxides (Soulie et al., 1994; Trolard et al., 1995), all collectively suggest that Pb is also associated with disordered Fe oxyhydroxides, in addition to phosphates. This interpretation is consistent with the Cu-like and Zn-like shape of the Pb extraction curves with EDDS and EDTA since these two organic ligands do not selectively dissolve poorly crystalline Fe oxyhydroxides. Equilibrium calculations presented in Section 4.2 support this interpretation.

In summary, desorption experiments showed that at least 11% and at most 100% of the metals could be removed from the soil with chelating agents, and that the extraction efficiency was higher when the chelating solution was renewed. Renewing the solution limits re-adsorption of the desorbed moieties, and increases the dissolution rate of any metal-containing particles by maintaining undersaturated conditions as in stirred-flow extractions (Strawn and Sparks, 2000). These two protocols cause desorption of metals that are held more strongly by soil constituents than surface complexes. The nature of the Zn-containing solid phases before and after extraction are identified below by μ -SXRF and EXAFS spectroscopy.

Table 4. Aqueous concentrations (mol/L) in supernatants for cycling extraction experiments.

	EDTA exposure, cycle number				
	1 (24 h)	2 (24 h)	3 (24 h)	4 (24 h)	5 (24 h)
[Ca] _{aq}	$4.67 \cdot 10^{-3}$	$5.79 \cdot 10^{-3}$	$6.31 \cdot 10^{-3}$	$6.41 \cdot 10^{-3}$	$5.71 \cdot 10^{-3}$
[Fe] _{aq}	$2.48 \cdot 10^{-4}$	$2.31 \cdot 10^{-4}$	$2.35 \cdot 10^{-4}$	$2.35 \cdot 10^{-4}$	$2.93 \cdot 10^{-4}$
[Al] _{aq}	$2.10 \cdot 10^{-5}$	$2.51 \cdot 10^{-5}$	$2.85 \cdot 10^{-5}$	$3.26 \cdot 10^{-5}$	$3.90 \cdot 10^{-5}$
[Mg] _{aq}	$2.30 \cdot 10^{-4}$	$1.85 \cdot 10^{-4}$	$1.61 \cdot 10^{-4}$	$1.53 \cdot 10^{-4}$	$1.45 \cdot 10^{-4}$
[Ti] _{aq}	$1.46 \cdot 10^{-6}$	$1.59 \cdot 10^{-6}$	$1.54 \cdot 10^{-6}$	$1.53 \cdot 10^{-6}$	$1.35 \cdot 10^{-6}$
[Zn] _{aq}	$1.36 \cdot 10^{-3}$	$2.27 \cdot 10^{-4}$	$1.35 \cdot 10^{-4}$	$9.99 \cdot 10^{-5}$	$1.07 \cdot 10^{-4}$
[Cu] _{aq}	$4.64 \cdot 10^{-4}$	$8.74 \cdot 10^{-5}$	$4.51 \cdot 10^{-5}$	$3.34 \cdot 10^{-5}$	$3.07 \cdot 10^{-5}$
[Pb] _{aq}	$1.33 \cdot 10^{-4}$	$4.27 \cdot 10^{-5}$	$2.68 \cdot 10^{-5}$	$2.06 \cdot 10^{-5}$	$2.18 \cdot 10^{-5}$
[P] _{aq}	$9.37 \cdot 10^{-4}$	$1.69 \cdot 10^{-4}$	$9.88 \cdot 10^{-5}$	$8.97 \cdot 10^{-5}$	$8.97 \cdot 10^{-5}$
Σ[MVC]	$7.12 \cdot 10^{-3}$	$6.58 \cdot 10^{-3}$	$6.94 \cdot 10^{-3}$	$6.99 \cdot 10^{-3}$	$6.34 \cdot 10^{-3}$
[Ca] _{aq} /Σ[MVC], %	66	88	91	92	90
[Ca] _{aq} /([Ca] _{aq} + [Fe] _{aq}), %	95.0	96.2	96.4	96.5	95.1
	EDDS exposure, cycle number				
	1 (24 h)	2 (24 h)	3 (24 h)	4 (24 h)	5 (24 h)
[Ca] _{aq}	$2.54 \cdot 10^{-3}$	$2.93 \cdot 10^{-3}$	$2.84 \cdot 10^{-3}$	$2.65 \cdot 10^{-3}$	$2.53 \cdot 10^{-3}$
[Fe] _{aq}	$1.80 \cdot 10^{-3}$	$1.23 \cdot 10^{-3}$	$1.03 \cdot 10^{-3}$	$1.04 \cdot 10^{-3}$	$1.03 \cdot 10^{-3}$
[Al] _{aq}	$1.25 \cdot 10^{-3}$	$8.70 \cdot 10^{-4}$	$5.85 \cdot 10^{-4}$	$5.25 \cdot 10^{-4}$	$3.18 \cdot 10^{-4}$
[Mg] _{aq}	$7.70 \cdot 10^{-4}$	$2.84 \cdot 10^{-4}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	$8.52 \cdot 10^{-5}$	$4.46 \cdot 10^{-5}$
[Ti] _{aq}	$5.34 \cdot 10^{-6}$	$6.10 \cdot 10^{-6}$	$5.07 \cdot 10^{-6}$	$5.34 \cdot 10^{-6}$	$4.05 \cdot 10^{-6}$
[Zn] _{aq}	$1.43 \cdot 10^{-3}$	$3.50 \cdot 10^{-4}$	$1.64 \cdot 10^{-4}$	$1.35 \cdot 10^{-4}$	$1.19 \cdot 10^{-4}$
[Cu] _{aq}	$6.68 \cdot 10^{-4}$	$1.40 \cdot 10^{-4}$	$5.18 \cdot 10^{-5}$	$3.67 \cdot 10^{-5}$	$2.89 \cdot 10^{-5}$
[Pb] _{aq}	$1.67 \cdot 10^{-4}$	$6.56 \cdot 10^{-5}$	$3.96 \cdot 10^{-5}$	$3.35 \cdot 10^{-5}$	$3.23 \cdot 10^{-5}$
[P] _{aq}	$1.35 \cdot 10^{-3}$	$7.70 \cdot 10^{-4}$	$7.94 \cdot 10^{-4}$	$8.11 \cdot 10^{-4}$	$8.49 \cdot 10^{-4}$
Σ[MVC]	$8.63 \cdot 10^{-3}$	$5.87 \cdot 10^{-3}$	$4.84 \cdot 10^{-3}$	$4.51 \cdot 10^{-3}$	$4.10 \cdot 10^{-3}$
[Ca] _{aq} /Σ[MVC], %	29	50	59	59	62
[Ca] _{aq} /([Ca] _{aq} + [Fe] _{aq}), %	58.5	70.4	73.5	71.9	71.1
	Citrate exposure, cycle number				
	1 (24 h)	2 (24 h)	3 (24 h)	4 (24 h)	5 (24 h)
[Ca] _{aq}	$1.37 \cdot 10^{-2}$	$4.83 \cdot 10^{-3}$	$1.94 \cdot 10^{-3}$	$6.42 \cdot 10^{-4}$	$3.17 \cdot 10^{-4}$
[Fe] _{aq}	$2.27 \cdot 10^{-3}$	$2.57 \cdot 10^{-3}$	$9.87 \cdot 10^{-4}$	$4.61 \cdot 10^{-4}$	$2.87 \cdot 10^{-4}$
[Al] _{aq}	$8.46 \cdot 10^{-4}$	$5.90 \cdot 10^{-4}$	$2.89 \cdot 10^{-4}$	$1.56 \cdot 10^{-4}$	$1.61 \cdot 10^{-4}$

[Mg] _{aq}	$5.11 \cdot 10^{-4}$	$5.89 \cdot 10^{-4}$	$7.58 \cdot 10^{-4}$	$3.74 \cdot 10^{-4}$	$2.06 \cdot 10^{-4}$
[Ti] _{aq}	$5.21 \cdot 10^{-6}$	$1.13 \cdot 10^{-5}$	$6.41 \cdot 10^{-6}$	$2.57 \cdot 10^{-6}$	$2.47 \cdot 10^{-6}$
[Zn] _{aq}	$5.87 \cdot 10^{-4}$	$3.30 \cdot 10^{-4}$	$8.92 \cdot 10^{-5}$	$3.37 \cdot 10^{-5}$	$2.07 \cdot 10^{-5}$
[Cu] _{aq}	$2.02 \cdot 10^{-4}$	$7.58 \cdot 10^{-5}$	$2.55 \cdot 10^{-5}$	$1.13 \cdot 10^{-5}$	$6.92 \cdot 10^{-6}$
[Pb] _{aq}	$2.36 \cdot 10^{-5}$	$8.04 \cdot 10^{-5}$	$4.84 \cdot 10^{-5}$	$2.32 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-5}$
[P] _{aq}	$1.55 \cdot 10^{-3}$	$1.57 \cdot 10^{-3}$	$5.75 \cdot 10^{-4}$	$1.72 \cdot 10^{-4}$	$4.43 \cdot 10^{-5}$
Σ[MVC]	$1.82 \cdot 10^{-2}$	$9.08 \cdot 10^{-3}$	$4.15 \cdot 10^{-3}$	$1.70 \cdot 10^{-3}$	$1.01 \cdot 10^{-3}$
[Ca] _{aq} /Σ[MVC], %	76	53	47	38	31
[Ca] _{aq} /([Ca] _{aq} + [Fe] _{aq}), %	85.8	65.3	66.3	58.2	52.5

3.3. Metal partitioning and chemical associations

Bicolor (RB, Red–Blue) and tricolor (RGB, Red–Green–Blue) μ -SXRF maps of the lateral distribution of Zn and Pb (R), Cu (B), and Fe (G) in two representative regions of the soil thin sections are presented in Fig. 2. The soil texture is heterogeneous as shown by the presence of several millimeters to submillimeter elongated and rounded features, dispersed in a silty to clayey matrix. These features have a different chemical composition in RB representation, some are concentrated in Cu (i.e., blue) and others in Zn or Pb (i.e., red). The elongated blue feature in the first region (Fig. 2a) was identified by optical microscopy and SEM-EDS as root debris. Point X-ray fluorescence analysis indicated a Cu(K α):Zn(K β):Pb(L α) ratio of 100:20:22 in this area. Its color remained blue when Fe was added in green in a tricolor (RGB) representation, indicating a low Fe concentration, in contrast to the matrix. The association of Cu with root debris suggests the existence of a Cu complex with organic matter. Many occurrences of Cu-containing root debris and detrital organic structures were observed in the two thin sections.

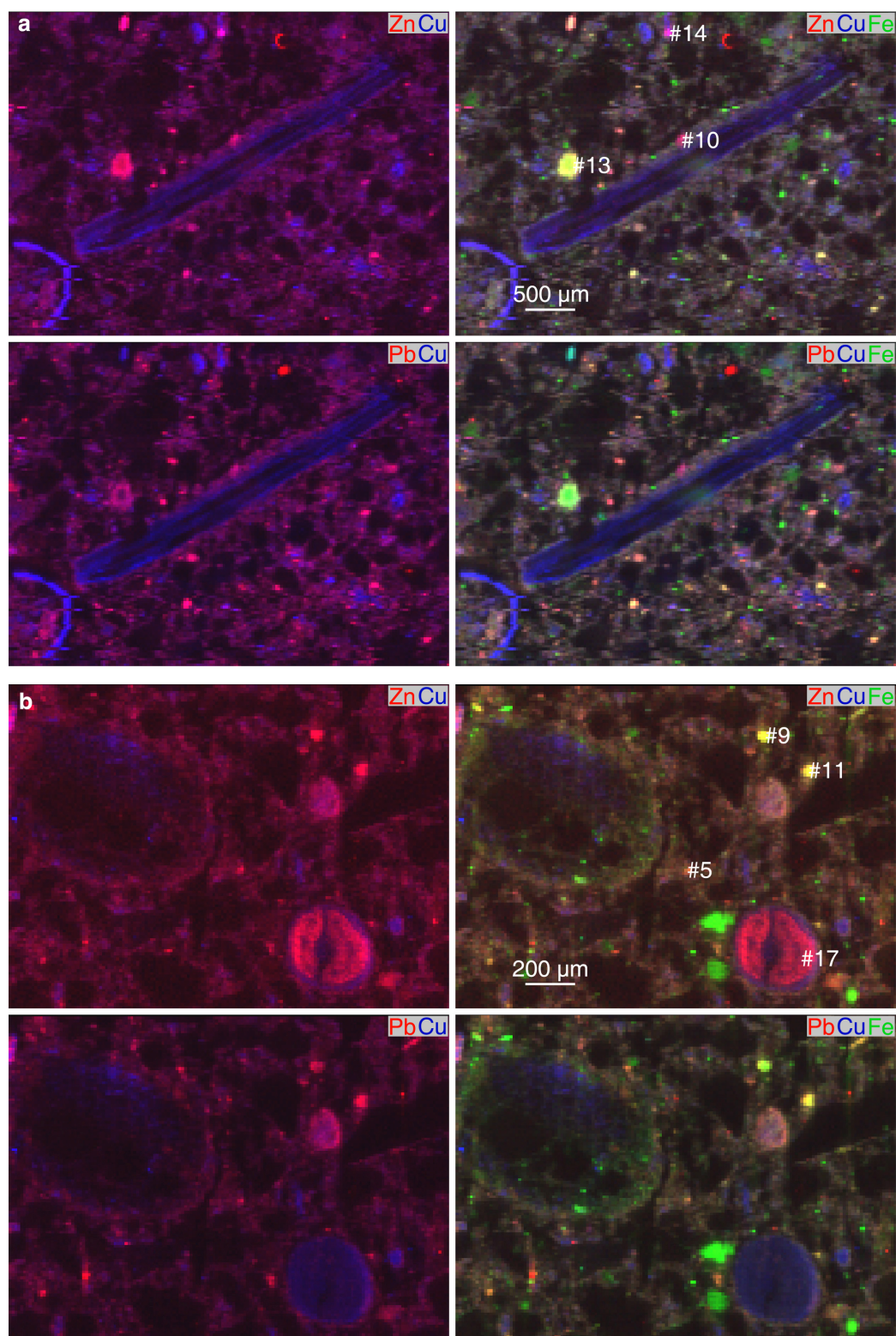


Fig. 2. Bicolor (left column) and tricolor (right column) μ -SXRF maps of the distribution of Zn and Pb (red), Cu (blue) and Fe (green) in two representative regions of two soil thin sections (a, b). The intensity of each color in each pixel is proportional to the concentration of the corresponding element. The overall brightness of a region is related to the sum of the concentrations, and the hue is related to the difference. The numbers indicate the spots where Zn K-edge μ -EXAFS spectra were collected. Steps of $20 \times 20 \mu\text{m}$, beam size = $16 \text{ (H)} \times 7 \text{ (V)} \mu\text{m}^2$ (FWHM).

The reddish to purple (mix of red and blue) cast of the maps in RB representation shows that, with one exception (grain POI #17), Zn and Pb are evenly distributed throughout the soil matrix. The occurrence of yellow and orange (mix of red and green) spots (i.e., POIs #5, #9, #11, #13) in RGB representation indicates that Zn and Pb are associated partly with Fe, but in amounts that vary greatly from one point to another. Some spots are green, suggesting that they are aggregates of Fe oxyhydroxides. In addition, Fe is present everywhere in the clayey matrix along with Zn, Pb, and Cu, as indicated by the brownish shade of the two tricolor maps. The almost uniform color of the matrix reveals that the soil is permeated with Fe, as is commonly observed (Singh and Gilkes, 1996; Manceau et al., 2004, 2005), but also with heavy metals. This elemental distribution suggests a structural or physical association of Zn, Pb and Cu with ferruginous clay particles. The typical Zn(K α):Cu(K α):Pb(L α):Fe(K α) ratio is 30:10:12:100.

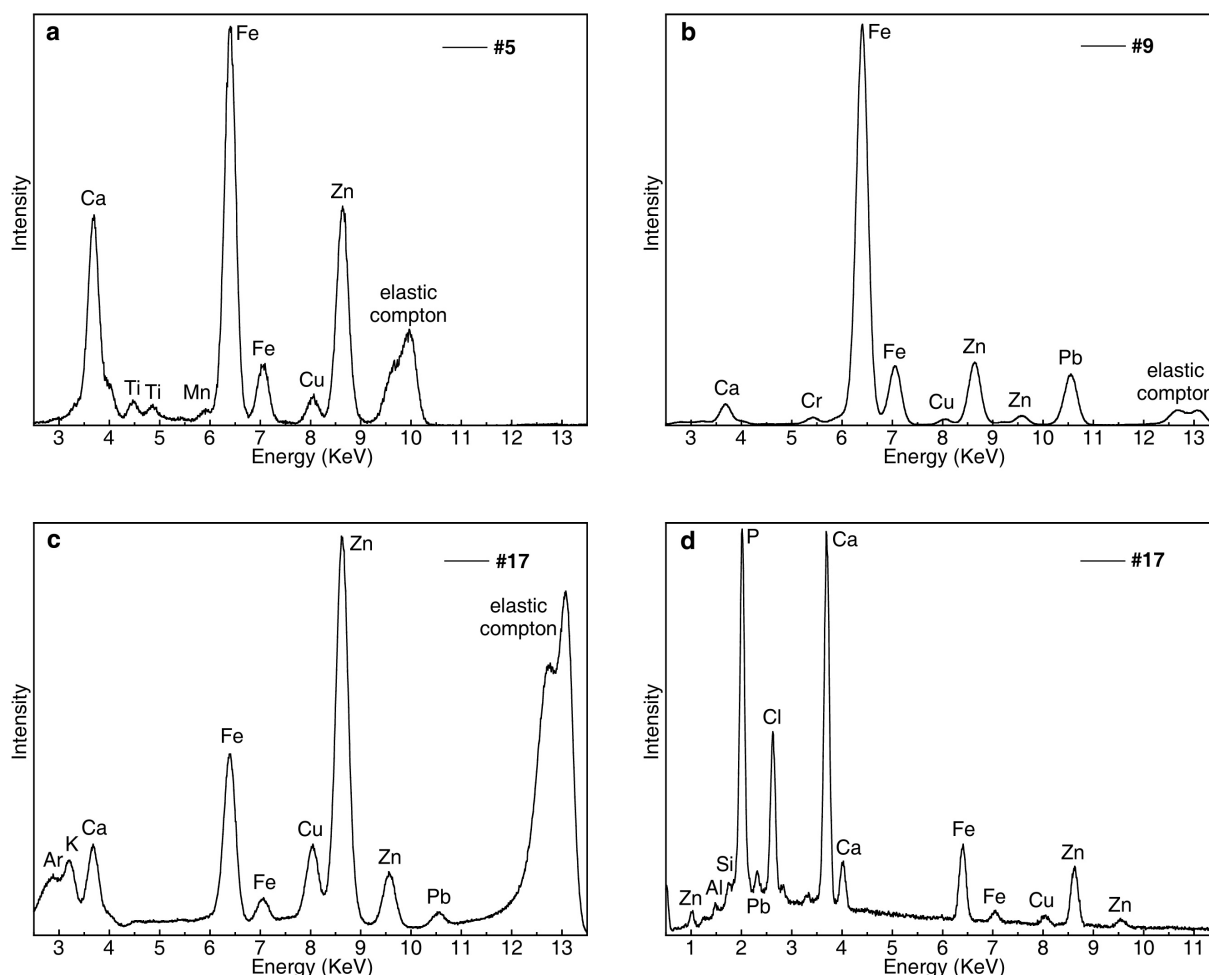


Fig. 3. Energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) spectra collected with a microfocused X-ray source at POIs #5 (a), #9 (b) and #17 (c) from the elemental maps presented in Fig. 2, and EDS spectrum collected on a scanning electron microprobe at POI #17 (d). The Fe:Zn ratio appears closer to 1:1 through SEM compared to μ -SXRF analysis because measurements were performed in vacuum in SEM and air in μ -SXRF. Beam size = 5 (H) \times 5 (V) μm^2 (FWHM).

The Zn-Fe and Pb-Fe associations imaged by μ -SXRF were confirmed by the calculation of cross-correlation values (ρ), which were high in the first mapped region ($\rho_{\text{Zn-Fe}} = 0.78$, $\rho_{\text{Pb-Fe}} = 0.71$, $\rho_{\text{Zn-Pb}} = 0.80$) and moderate in the second region ($\rho_{\text{Zn-Fe}} = 0.53$, $\rho_{\text{Pb-Fe}} = 0.57$, $\rho_{\text{Zn-Pb}} = 0.64$). The lower ρ values in the second region suggest that some Zn and Pb is not correlated with Fe. The EDS spectra collected at POIs #5, #9 and #17 show highly contrasting Zn(K α):Fe(K α) ratios: 55:100 at POI #5, 16:100 at POI #9, and 100:45 at POI #17 (Figs. 3a-c). If a Zn-containing Fe oxyhydroxide species exists, then it is most likely mixed with other species in variable proportions from point to point. The EDS spectrum collected at the large coffee bean feature (#17) about 300 μm in diameter exhibited an intense Zn fluorescence peak, and low intensity Cu and Pb peaks (Zn(K α):Cu(K α):Pb(L α) equal to 100:23:6) (Fig. 3d). This feature is also depleted in Fe relative to the matrix (Fe(K α)_{area}:Fe(K α)_{matrix} = 50:100), suggesting that Zn is probably not associated with the Fe. This result partly explains the lower $\rho_{\text{Zn-Fe}}$ value of the second region. Since light elements are not easily detected on the 10.3.2 hard X-ray microprobe, SEM was used to complete the analysis of the coffee bean. An intense X-ray line with a Zn(K α):P(K α) ratio of 17:100 suggests a Zn phosphate (Fig. 3d). This grain also contains major Ca and Cl, and minor Si, Al, and K. In contrast with Zn, whose distribution pattern resembled two half-moons, Cu was evenly distributed within the two half-moons (see the R(Pb)–B(Cu) map) and also in the central part of the grain and on its rim (see the R(Zn)–B(Cu) map). In R(Zn)–B(Cu) representation, the edge and the central regions appear purple because they contain some Zn, but only one fifth that of the half-moons. In contrast, the half-moons are reddish because the Cu signal is masked by the intense Zn signal (Zn(K α)_{moons}:Cu(K α)_{moons} equal to 100:23). The uneven distribution of Cu and Zn suggests different speciation for the two metals. Two types of components were identified by SEM: organic cells with preserved shapes that are distributed homogeneously throughout the disk-shaped area, and microcrystalline minerals that occur interstitially between organic cells and form the skeleton of the two half-moon aggregates (Fig. 4). Therefore, we conclude from the μ -SXRF analysis and SEM observations that Cu is associated with the organic component and Zn with the mineral component.

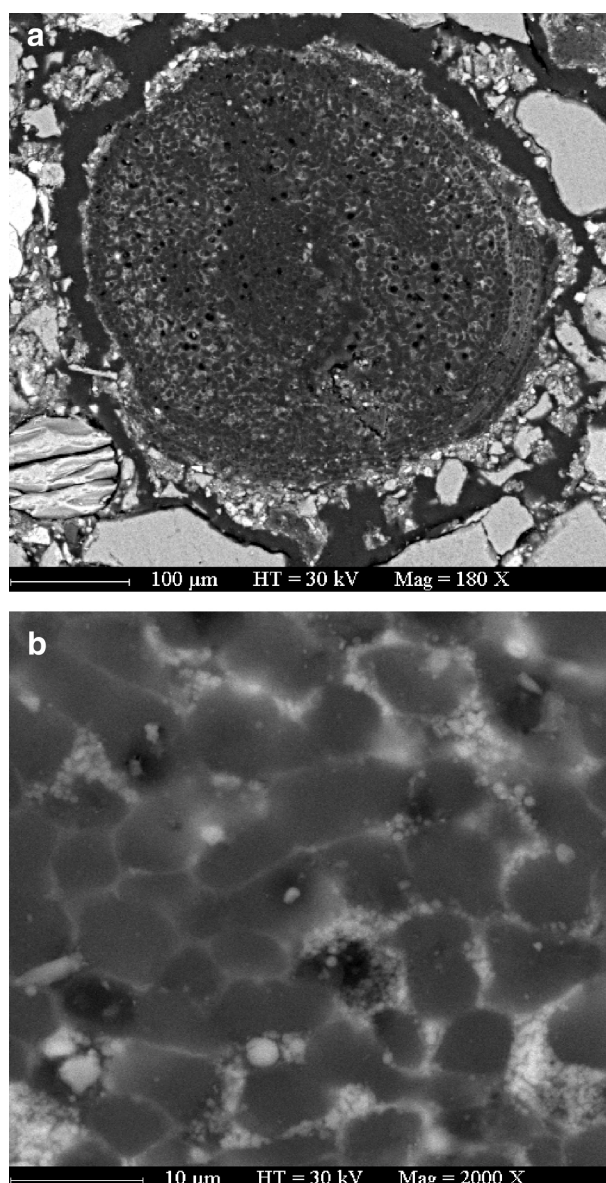


Fig. 4. Scanning electron micrographs of the 'coffee bean' area from the elemental map presented in Fig. 2b, at 180× (a) and 2000× (b) magnification. The higher magnification clearly shows a pseudomorphic texture containing biological cells and microcrystalline mineral precipitates. The lower magnification shows that the cells are homogeneously distributed in the grain, whereas the microcrystalline minerals form two half-moon aggregates.

3.4. Nature of Zn species

On the basis of the μ -SXRF results, eighteen POIs (some of them are marked on the μ -SXRF maps in Fig. 2) were selected for Zn K-edge μ -EXAFS measurements. Of these spectra, 17 could be classified into two groups on the basis of their appearance (Fig. 5). The remaining spectrum, collected at a Zn 'hot spot' about $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, was identical to that of gahnite (ZnAl_2O_4 , Fig. 6). The spectra from the first group were collected in clay-rich areas,

whereas those from the second group were collected in either Fe- or P-rich areas. The first set of spectra resembles that of Zn-containing kerolite $\text{Si}_4(\text{Mg}_{1.65}\text{Zn}_{1.35})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (ZnKer135), a trioctahedral phyllosilicate (Fig. 5a). The spectrum of ZnKer135 exhibits splitting of the first EXAFS oscillation at $\sim 3.8 \text{ \AA}^{-1}$, which is systematically observed when Zn is six-fold coordinated and its octahedron shares edges with those of 'light' elements (Mg or Al) as in some phyllosilicates, gibbsite, lithiophorite and hydroxy-Al interlayered 2:1 clay minerals (Manceau et al., 1987, 2000b, 2004, 2005; Scheinost et al., 2002). The nature of the host mineral will be determined below by PCA, but lithiophorite can be disregarded immediately because no Mn was detected. Although the spectra from #4 to #7 do not have their first EXAFS oscillation split, they were classified in this group because their third oscillation is halved in a similar manner as in kerolite. This series of spectra clearly contains at least two Zn forms, which may be either a phyllosilicate with a variable stoichiometry (i.e., varying amounts of 'heavy' and 'light' atoms in its octahedral sheet), or an unknown Zn species mixed with a single phyllosilicate.

The spectra of the second group have their first oscillation shifted to higher k values, relative to those from the first group (4.2 vs. 3.8 \AA^{-1}), indicating that Zn is in tetrahedral coordination. These spectra also have lower amplitude, suggesting that Zn is surrounded by 'light' atoms or forms surface complexes. In agreement with the Zn-Fe and Zn-P chemical associations identified by μ -SXRF, an overall spectral similarity was observed between the unknowns of the second group and Zn-sorbed ferrihydrite (ZnFh) and Zn-containing phosphate (ZnPhos) (Fig. 5b). However, attempts to reconstruct the unknown spectra with a linear combination of ZnFh and ZnPhos failed, which suggests either that one of the two inferred species is invalid or that they are mixed with a third species.

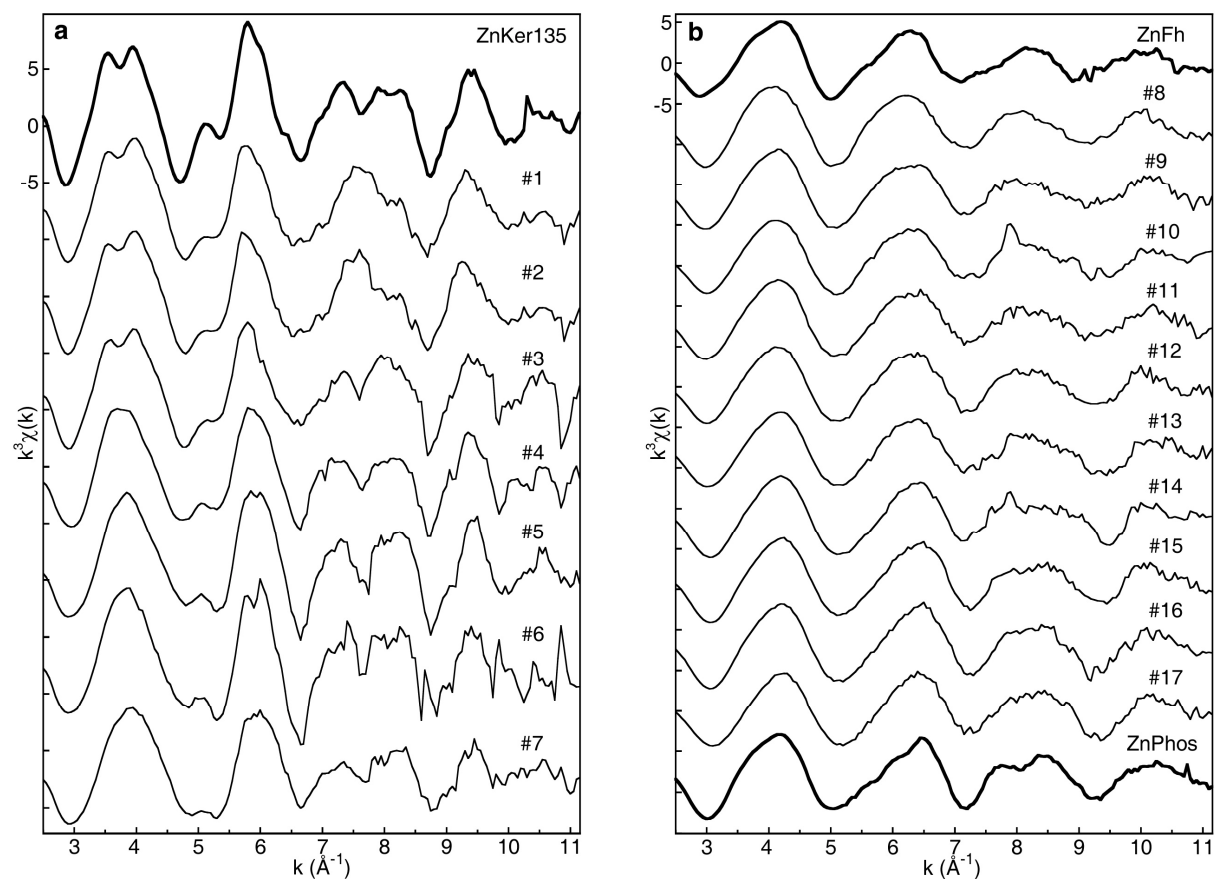


Fig. 5. Zn K-edge k^3 -weighted μ -EXAFS spectra collected at different POIs of the two soil thin sections. Spectra are grouped in two populations according to their visual appearance, and compared with three reference spectra, (Zn,Mg)-containing kerolite (ZnKer135), in which Zn is octahedrally coordinated to oxygens (a), and Zn-sorbed ferrihydrite (ZnFh) and Zn phosphate (ZnPhos), in which Zn is tetrahedrally coordinated to oxygens (b).

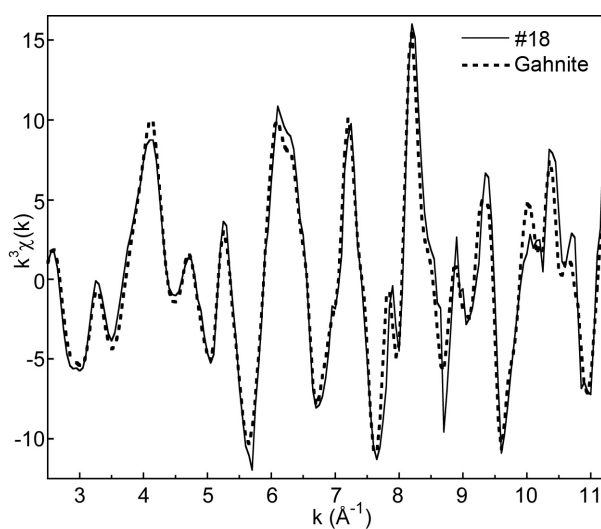


Fig. 6. Zn K-edge k^3 -weighted μ -EXAFS spectrum collected at POI #18 (solid line) and its one-component fit to gahnite (dotted line).

PCA showed that the set of 17 multi-component μ -EXAFS spectra could be reduced to four orthogonal components, as indicated by the *IND* values (Table 5). Reconstruction of the 17 spectra with the first two, three, four, five, six, and seven components confirmed that the first four components were necessary to reproduce all experimental spectral features, and a trade-off in signal-to-noise ratio was observed between the fourth and fifth component. Therefore, the target transformation of the reference compounds from our database was performed in the orthogonal base of the four components. The quality of the transformation was examined visually and quantified by the residual *R* value between the original and the target-transformed reference spectra. Four families of Zn species were positively identified and retained as proxies: Zn-sorbed ferrihydrite (ZnFh), Zn phosphate dihydrate (ZnPhos), medium-Zn kerolite (ZnKer135), and willemite (Willem) (Fig. 7a).

Table 5. Output parameters from PCA.

Component	Eigenvalue	<i>IND</i> ^a
1	120.0	0.0828
2	76.4	0.0423
3	23.8	0.0384
4	17.7	0.0360
5	11.1	0.0379
6	9.9	0.0402
7	8.4	0.0436

^a Indicator value, for details see Manceau et al. (2002b).

Among the iron oxyhydroxides available in our database, Zn-sorbed ferrihydrite (ZnFh), in which Zn is fully tetrahedral (Waychunas et al., 2002; Trivedi et al., 2004), yielded the best reconstruction with lower *R* value (*R* = 0.23). The assumption of Zn-sorbed goethite (not shown) and Zn-substituted goethite (ZnGoet), in which Zn is octahedral, yielded poor reconstructions with *R* values equal to 0.72 and 0.74, respectively (Fig. 7b). In particular, the shape of the first oscillation for goethite was not correctly reproduced by the target transformation, because this region of the spectrum is sensitive to the ^{IV}Zn/^{VI}Zn ratio, with the frequency being left-shifted when the Zn-O distance increases (Schlegel et al., 1997). Of the various Zn phosphate references tested, Zn phosphate dehydrate (Zn₃(PO₄)₂·2H₂O) yielded the best reconstruction (*R* = 0.25) (Fig. 7a). Other forms of Zn phosphate, including scholzite

(not shown) and Zn-reacted hydroxyapatite (ZnApat), gave poorer reconstruction with $R = 0.68$ and $R = 0.77$, respectively (Fig. 7b).

Among the Zn phyllosilicate family of spectra, medium-Zn kerolite ($\text{Si}_4(\text{Mg}_{1.65}\text{Zn}_{1.35})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ZnKer135) gave the best spectral reconstruction ($R = 0.59$). The target testing of dioctahedral Zn-phyllosilicate, simulated here with the Zn-substituted montmorillonite from Redhill ($[\text{Zn}] = 85 \text{ mg/kg}$) (ZnMont), was unsatisfactory ($R = 1.38$). Fig. 7 shows that the original and reconstructed spectra for ZnMont differed in shape and in phase in the $5\text{--}9 \text{ \AA}^{-1}$ k -interval, whereas good agreement was obtained with the medium-Zn (ZnKer135) trioctahedral kerolite reference. This suggests that Zn has a trioctahedral local environment in the phyllosilicate species, as often observed in soils and sediments (Isaure et al., 2005; Panfili et al., 2005). The average stoichiometry of the soil Zn phyllosilicate was estimated by testing several kerolite references with various Zn/Mg ratios. The reconstruction was poor with the pure-Zn end-member ($\text{Si}_4\text{Zn}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, data not shown, $R = 0.81$), and worse with the low-Zn end-member ($\text{Si}_4\text{Zn}_{0.03}\text{Mg}_{2.97}\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ZnKer003, $R = 0.94$). We note that, in contrast to the dioctahedral reference, the original and reconstructed spectra for the trioctahedral hydrous silicate references were always in phase over the experimental k interval, independently of their Zn/Mg ratio, strengthening the improbability of montmorillonite as a possible Zn species. The possibility of a Zn surface complex on the edges of phyllosilicate layers was discarded by testing Zn-sorbed hectorite ($R = 1.18$, data not shown) (Schlegel et al., 2001a,b). Other tested layered Zn species include (Zn,Al)-hydrotalcite and hydroxy- Al interlayered phyllosilicate, but the obtained R values were in the same high range as montmorillonite (1.28 and 1.39, respectively) (data not shown).

The fourth and last identified species is willemite, an anhydrous Zn silicate (Zn_2SiO_4 , $R = 0.59$). The spectrum of this species has a characteristic sharp-pointed resonance at 8 \AA^{-1} (Fig. 7a), which can be used to ascertain its presence in a mixture, as observed in Fig. 5b for the spectra collected at POIs #10 and #14. A number of other Zn species previously identified or inferred in contaminated soils and sediments, including minerals such as zincite (Fig. 7b), sphalerite, franklinite, organic Zn complex with humic and low-molecular-weight organic acids (Isaure et al., 2002; Sarret et al., 2004; Panfili et al., 2005) were tested and led to poor reproduction of the data, which indicates that these species are not present in significant amount in the studied soil (i.e., <5-10% of total Zn, depending on the reference). In summary, four Zn species were identified by PCA, Zn-sorbed ferrihydrite, Zn phosphate, medium-Zn kerolite, and willemite, in addition to gahnite identified in a hot spot.

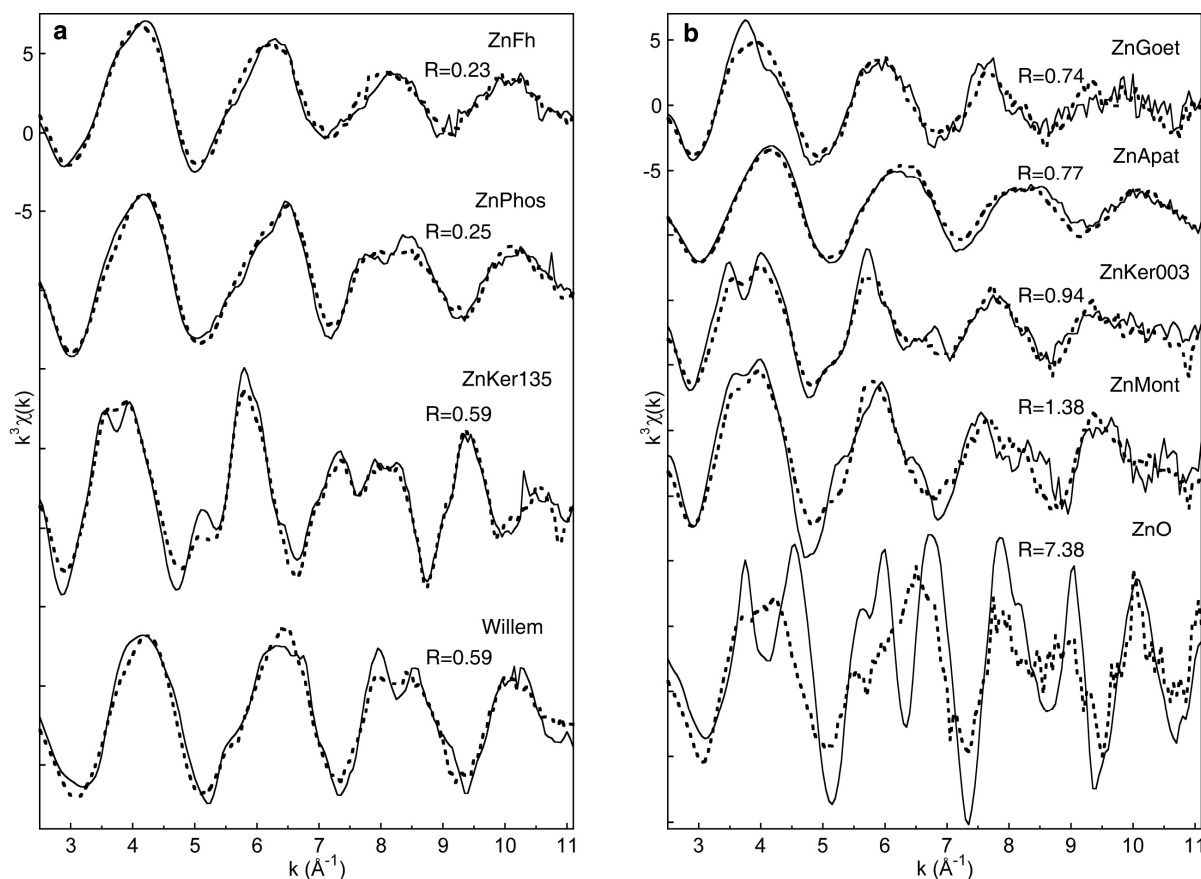


Fig. 7. Zn K-edge k^3 -weighted EXAFS spectra and target transformations of a selection of Zn reference compounds. The quality of the transformation is evaluated by the residual R value between the original reference spectrum (solid line) and the target transformed spectrum (dotted line). (a) Zn-sorbed ferrihydrite (ZnFh), Zn phosphate dihydrate (ZnPhos), medium-Zn kerolite (ZnKer135), and willemite (Willem) are statistically the most likely Zn species. (b) Zn-substituted goethite (ZnGoet), Zn-reacted hydroxyapatite (ZnApat), low-Zn kerolite (ZnKer003), Zn-substituted montmorillonite (ZnMont) and zincite (ZnO) are discriminated from the four likely species in a statistically meaningful way.

The nature and proportion of the Zn species at each POI was determined next by LCF of the 17 multi-component μ -EXAFS spectra to the five identified Zn species. The sensitivity of this approach is illustrated below with three spectra, one from the clayey matrix (POI #5), one from an Fe-rich area (POI #9), and one from a P-rich area (POI #17) (Fig. 8). The one-component fit to spectrum #5 identified medium-Zn kerolite as the most likely species ($R = 0.76$). Adding Zn ferrihydrite significantly improved the fit as indicated by the 48% decrease in R ($R = 0.39$). Zn ferrihydrite was often detected together with Zn phyllosilicate, presumably because of its nanodivided nature and its frequent occurrence as ‘background’ species in soil matrices (Hochella et al., 1999; Manceau et al., 2002b). This species is probably responsible for the brownish cast of the two μ -SXRF maps in RGB representation (Fig. 2). The one-component fit to spectrum #9 identified Zn ferrihydrite as the

most likely major Zn species at this spot ($R = 0.40$), in keeping with the high Zn–Fe correlation measured by μ -SXRF. A two-component fit was attempted, and the assumption of a mixture of 79% Zn ferrihydrite and 20% willemite decreased R by 28% ($R = 0.29$). The one-component fit to spectrum #17 identified Zn phosphate, in agreement with the Zn–P correlation at this point. Adding willemite in a two-component fit improved the spectral match and reduced R by 48%. For the three spectra shown in Fig. 8, the proportion of the third phase obtained with three-component fits was $<10\%$ and, thus, was considered insignificant enough to only consider two-component combinations. In particular, no layer double hydroxide (LDH) was detected at POI #5, which is consistent with the transformation of this species into phyllosilicate with time (Voegelin et al., 2005).

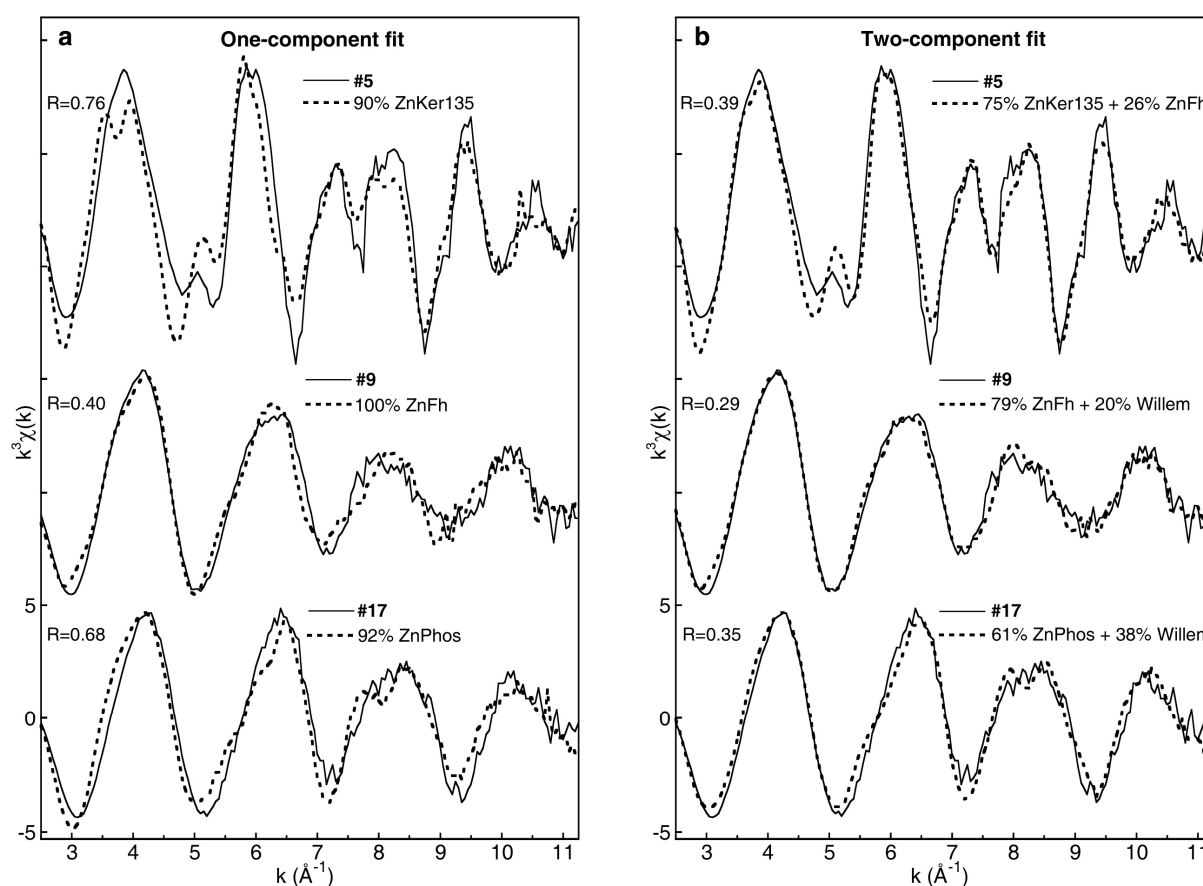


Fig. 8. Zn K-edge k^3 -weighted μ -EXAFS spectra (solid line) collected at POIs #5, #9 and #17, and their best one- (a) and two-component (b) fits (dotted line).

In summary, all multi-component μ -EXAFS spectra presented in Fig. 5 were fitted successfully to linear combinations of only two components taken from the set of the four Zn species identified by PCA : ferrihydrite, phosphate, phyllosilicate, and willemite. Gahnite was found in one Zn ‘hot spot’, and never in a mixture with other Zn species at the analyzed POIs.

3.5. Quantitative speciation of Zn in the untreated soil

The fractional amounts of each Zn species in the soil were determined by LCF of the EXAFS spectrum of the powdered soil sample to linear combinations of the EXAFS spectra of the five identified Zn species. The powder EXAFS spectrum (noted x 0) looks intermediate in phase, shape and amplitude to the two μ -EXAFS spectra collected at POIs #5 and #17 (Fig. 9). To a first approximation, the three spectra seem to belong to a pseudobinary system, in which one end-member is spectrum #5 (mixture of 75% Zn kerolite and 26% Zn ferrihydrite) and the other is spectrum #17 (mixture of 61% Zn phosphate and 38% willemite). However, the bulk soil spectrum could not be described quantitatively by a linear combination of the two two-component spectra, according to $\alpha \cdot (0.75\text{Zn-Ker} + 0.26\text{ZnFh}) + (1 - \alpha) \cdot (0.61\text{ZnPhos} + 0.38\text{Will})$. If this were the case, then the x 0, #5 and #17 spectra would all intersect at the same points, called isosbestic points (Manceau et al., 1998), which is clearly not the case, for example at 4.9, 5.4, and 9.0 Å⁻¹. This means that the ratio of ZnKer to ZnFh, and of ZnPhos to Willem measured at POIs #5 and #17 are not constant throughout the powdered sample. The lower amplitude of the powder spectrum relative to the two μ -EXAFS spectra results from the higher multiplicity of the Zn structural environments in the soil volume, thereby justifying multiple-species fits. Results from the LCF indicated that Zn ferrihydrite, Zn phosphate and Zn kerolite are predominant, because omitting any of these species significantly degraded the quality of the simulation (Fig. 10). Adding willemite in a four-component fit improved the spectral match and decreased the *R* by 17%, the best statistical agreement being obtained with a mixture of 30% Zn ferrihydrite, 28% Zn phosphate, 24% medium-Zn kerolite, and 11% willemite (*R* = 0.19). Ten percent of willemite in the four-component fit corresponds to the generally accepted detection limit of metal species by this linear least-squares combination fit analysis of EXAFS spectra (Manceau et al., 1996; Ostergren et al., 1999; O'Day et al., 2000; Isaure et al., 2002). Gahnite represents less than 10% of total Zn, because adding this component did not significantly improve the spectral simulation.

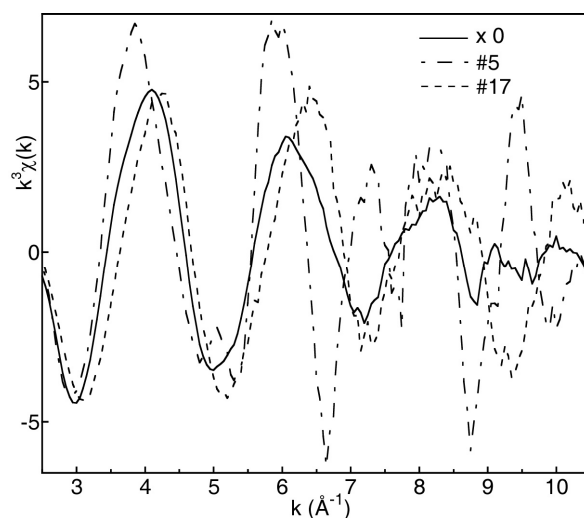


Fig. 9. Zn K-edge k^3 -weighted powder EXAFS spectrum of the bulk soil (x 0) together with the two μ -EXAFS spectra collected at POIs #5 and #17.

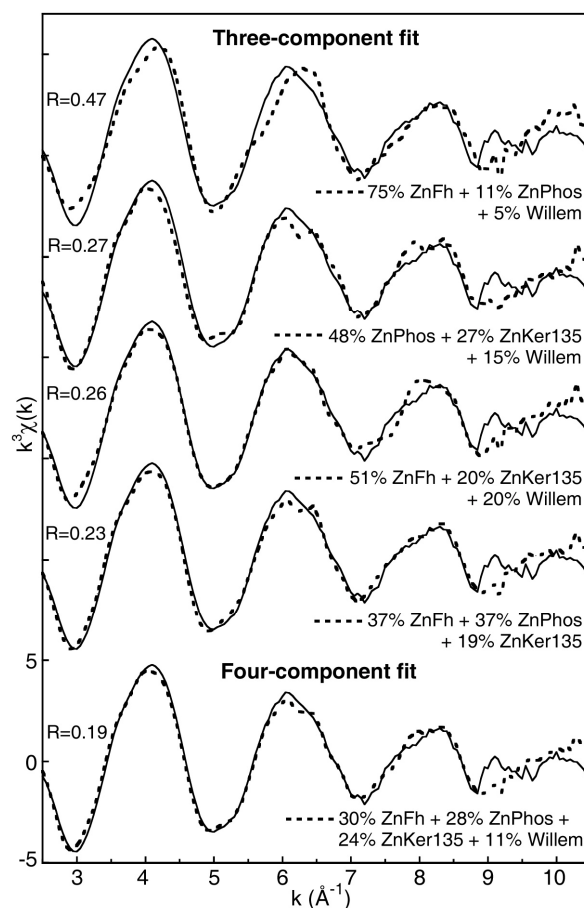


Fig. 10. Zn K-edge k^3 -weighted EXAFS spectrum of the powdered soil sample (solid line) with three and four-component least-squares fits to linear combination of reference spectra (dotted line). The bulk soil spectrum is best simulated ($R = 0.19$) with a mixture of 30% Zn-sorbed ferrihydrite, 28% Zn phosphate, 24% medium-Zn kerolite, and 11% willemite (estimated accuracy $\pm 10\%$ of the total zinc). Gahnite, firmly identified by μ -EXAFS, represents less than 10% of the total Zn, because adding this component did not significantly improve the spectral simulation.

3.6. Quantitative speciation of Zn in the soil after chemical treatments

In the following, the effect of citrate, EDDS, and EDTA treatments on the forms of zinc in the soil is examined. Fig. 11 shows the Zn K-edge powder EXAFS spectra of the soil before (x 0) and after 24 h treatment with citrate (x Ci), EDDS (x EDDS) and EDTA (x EDTA), together with the reference spectra of the four major Zn species initially present in the soil. The three chemical treatments modified the shape of the second and third EXAFS oscillations in a similar manner, rendering them more symmetrical than they were initially in x 0. In particular, the doublet of the third oscillation, which is marked in ZnPhos (black arrows in Fig. 11), and still apparent in x 0, has disappeared. Concomitantly, two shoulders on the left tail of the second oscillation are noticeable after treatment (semi-black arrows in Fig. 11). These spectral changes, added to the fact that the three extractants removed about the same amount of Zn (citrate 43%, EDDS 42%, and EDTA 40%), suggest that the Zn phosphate species was dissolved preferentially after 24 h, thereby increasing the proportions of remaining species in the treated soil fractions. To confirm this hypothesis and quantify the speciation of Zn in the treated soil, the spectra of the treated soil were fitted by linear combination of the five Zn species. The one-, two-, and three-component fits of the treated and untreated soils are shown in Fig. 12, and the fractions of each component are given in Table 6. Best one-component fits were obtained with Zn ferrihydrite, then Zn kerolite was revealed as the second most likely species, and finally willemite as the third species. The three-component model yielded the best fit for the three treated soil fractions, as indicated by *R* values and the closeness to 100% of the sum of all species. Adding Zn phosphate as a fourth component did not improve significantly the fits, in contrast to the spectrum of the untreated soil (x 0). For this last sample, adding Zn phosphate decreased the *R* value by 27% (Table 6).

Zn phosphate, which amounted to $28 \pm 10\%$ of total Zn in the untreated soil, is below the detection limit in the three treated samples, which indicates that it was dissolved preferentially. The mole fraction of Zn kerolite slightly increased from $\sim 24\%$ in the untreated soil to ~ 29 to 30% in the treated soil. Because of the high-amplitude and multiple-frequency shape of this reference spectrum, its contribution to the total EXAFS signal became visible after treatment, as seen by the appearance of the two shoulders on the left side of the second oscillation, which are reminiscent of the two shape resonances of the kerolite spectrum at 5.2 and 5.8 \AA^{-1} . The relative proportion of willemite remained almost constant after citrate and EDDS treatment, but increased by $\sim 6\%$ with EDTA.

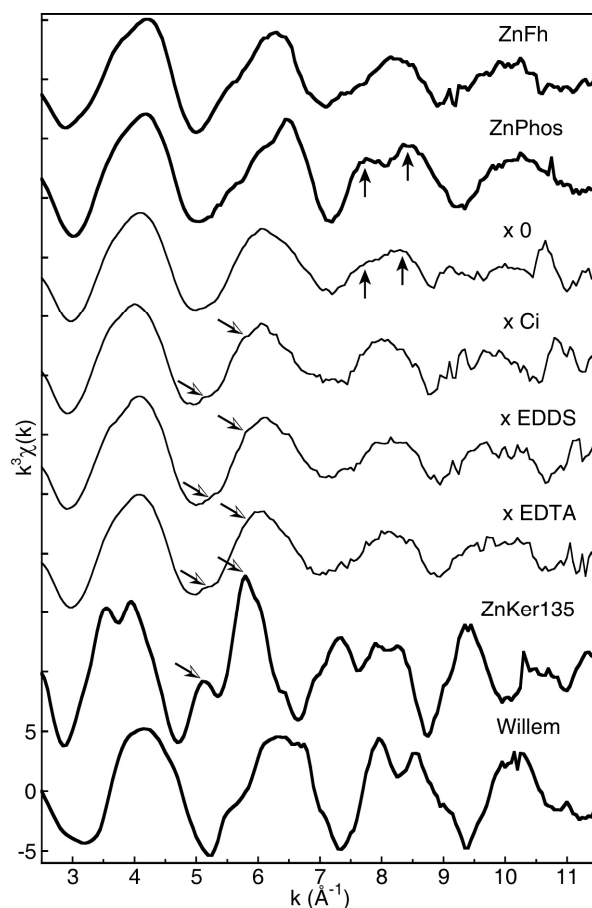


Fig. 11. Zn K-edge k^3 -weighted EXAFS spectra of the powdered samples for the untreated soil (x 0) and the residuals after 24 h contact time with citrate (x Ci), EDDS (x EDDS), and EDTA (x EDTA), together with the reference spectra of the major Zn species identified in the untreated soil.

Table 6. Relative proportions of Zn species determined by LCF.

Sample	Number of components	ZnFh (%)	ZnKer135 (%)	Willem (%)	ZnPhos (%)	Sum (%)	R
x 0	1	86				86	0.48
	2	78	13			91	0.34
	3	51	20	20		91	0.26
	4	30	24	11	28	93	0.19
x Ci	1	84				84	0.90
	2	68	24			92	0.37
	3	52	29	12		93	0.30
x EDDS	1	92				92	0.44
	2	76	16			92	0.23
	3	54	29	10		93	0.18
x EDTA	1	84				84	0.90
	2	70	22			92	0.40
	3	46	30	17		93	0.32

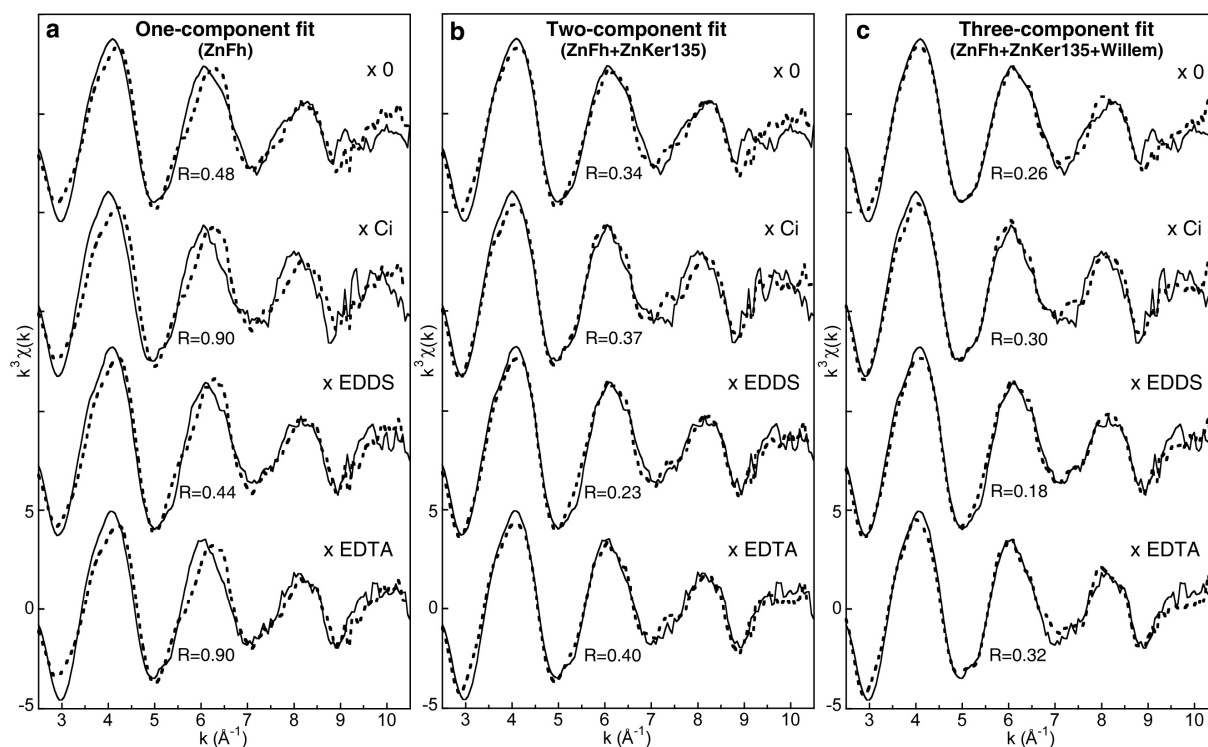


Fig. 12. Zn K-edge k^3 -weighted EXAFS spectra of the untreated soil (x 0) and of the residuals after 24 h contact time with citrate (x Ci), EDDS (x EDDS) and EDTA (x EDTA) (solid lines), together with one-, two-, and three-component fits (dotted line) using Zn-sorbed ferrihydrite (a), plus medium-Zn kerolite (b), and plus willemite (c). The fractions of each component are listed in Table 5. The residual R value was minimum and the sum of Zn species was close to 100% with the three-components model (Zn-sorbed ferrihydrite + medium-Zn kerolite + willemite) for the three residuals (x Ci, x EDDS, x EDTA). Adding Zn phosphate as fourth component did not improve significantly the spectral fits, in contrast to the spectrum of the untreated soil (x 0), which is best fitted with a four-components model (Zn-sorbed ferrihydrite + medium-Zn kerolite + willemite + Zn phosphate) (see Fig. 10). The sum of all fractions equals 93% in each case, confirming that the number of species included in the fit is reasonable.

Some zinc liberated by phosphate dissolution may have been readsorbed on other phases. To test this, the fractional amount of each Zn species after treatment was compared to the fractional amount of each Zn species before treatment. Results reported in Fig. 13 show that the proportions of Zn species are, within precision, the same in the treated and untreated samples: ~30% Zn ferrihydrite, ~24% Zn kerolite, and ~11% willemite. Another way to look at the data is to compare the fractional amount of Zn phosphate in the untreated soil ($28 \pm 10\%$) and the difference to 100% (or 93% if using experimental values in Table 6) of the sum of the normalized proportions of each species in the treated soil (~40%). These two values are conservative, which means that the amount of dissolved Zn is the same as the amount of Zn phosphate in the native soil. This Zn phosphate pool is the most labile in the

presence of complexing organic compounds, and is solubilized with a good selectivity since no reagents seem to have modified significantly the proportions of Zn ferrihydrite, Zn kerolite, and willemite.

Dissolution of Zn phosphate was confirmed by the Zn and P concentrations in the extracted solutions (Fig. 14a). The dissolved Zn/P molar ratio was 1.0 with EDDS and 1.5 with EDTA, similar to the ratio in Zn phosphate dihydrate ($\text{Zn/P} = 1.5$), the model compound used as a proxy for the family of Zn phosphate minerals. This ratio was 0.4 with citrate, suggesting that this organic molecule extracted other P-containing phases. If the Zn/P molar ratio of the citrate-extracted Zn phosphate is 1.5, then about 6% of the 24% P extracted with citrate was bound to Zn. The other 18% P ought to be bound to other dissolved cations. This inference is consistent with the analysis of dissolved Fe and Ca, since citrate extracted more Fe (11%) than EDDS (4%) and EDTA (0.5%) and, above all, more Ca (28 vs. 2 and 4%, respectively) (Fig. 14b). The possible co-dissolution of Zn-, Ca- and Fe-containing phosphates by citrate is consistent with its lack of selectivity for heavy metals, as discussed in Section 4.2.3.

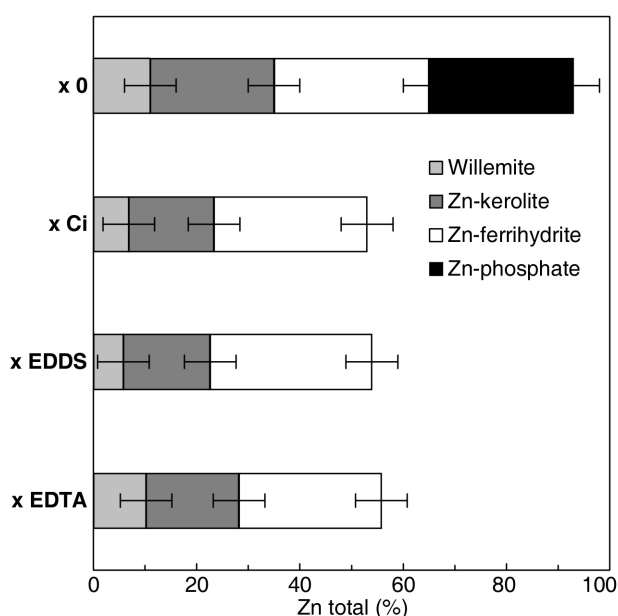


Fig. 13. Mole fractions of Zn species in the soil before (x 0) and after 24 h chemical treatment with citrate (x Ci), EDDS (x EDDS), and EDTA (x EDTA). Values for the treated samples were normalized to the sum of Zn species in the untreated soil (i.e., 93% of total initial Zn). The uncertainty is estimated to $\pm 10\%$ of total zinc. The results clearly show that the Zn phosphate species is absent in the three residuals, and that the fractional amount of the three other species is conservative among all samples, meaning that the chelating agents selectively dissolved the Zn phosphate component species.

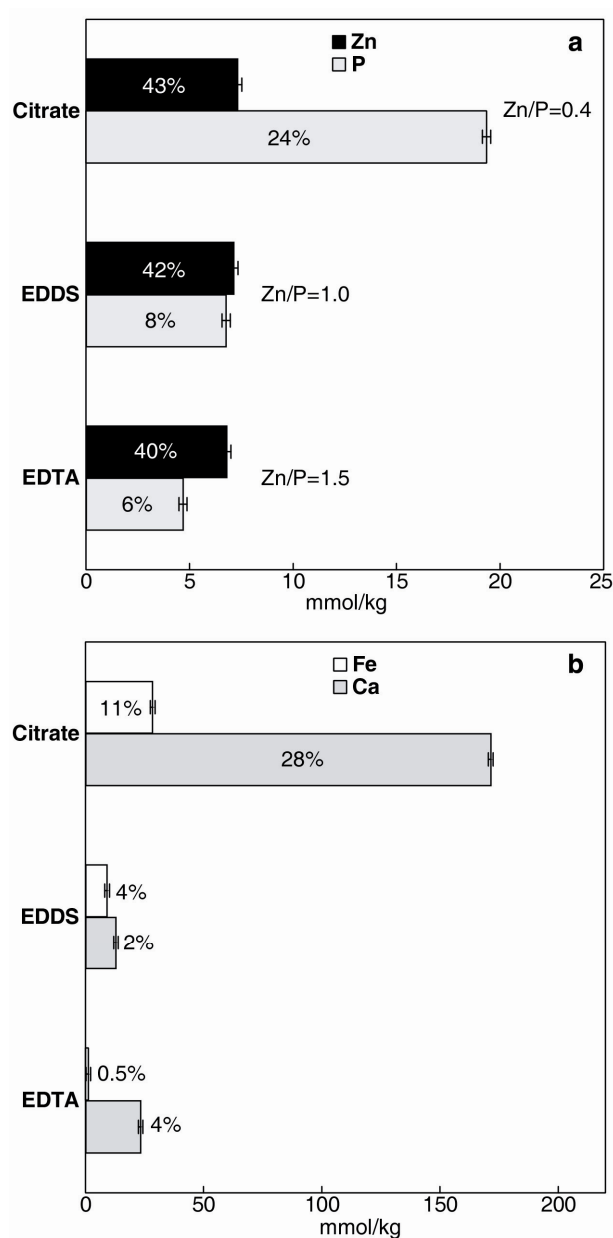


Fig. 14. Aqueous concentration of Zn and P (a), and Fe and Ca (b) in the extraction solution after 24 h of reaction time with citrate, EDDS and EDTA. Error bars indicate the deviation from duplicates. The percentages correspond to the weight fractions of the extracted elements. The Zn/P molar ratios in the extracted solutions are also indicated.

In summary, the combination of chemical extractions with quantitative EXAFS analysis revealed that citrate, EDDS, and EDTA selectively dissolved Zn phosphate after 24 h of treatment, and were essentially inert during this reaction time with respect to Zn ferrihydrite, phyllosilicate and willemite, the three other major forms of Zn in the soil. The reasons for the higher solubility of Zn phosphate to the three extractants are discussed below.

4. Discussion

4.1. Original Zn speciation in soil

Five Zn-bearing minerals were identified in this study: Fe oxyhydroxide, phosphate, phyllosilicate, willemite, and gahnite, in proportions of ~30, 28, 24, 11, and less than 10%, respectively. About 80% of Zn is associated with hydroxylated secondary minerals, and the remainder with dehydroxylated (i.e., willemite and gahnite), and probably primary in origin, minerals. Despite the high organic content of the soil, no organic forms of Zn were detected. Thus, the mobility of Zn in the original soil under real field conditions is controlled mostly by the formation of secondary minerals.

Zn-sorbed Fe oxyhydroxide is the first of the major forms of Zn in the soil, and was modeled with ^{IV}Zn-sorbed ferrihydrite. Although we have no direct evidence for this species (i.e., it was always mixed with other species), our finding is supported by three arguments. First, the target testing revealed that Zn in the soil iron oxyhydroxide aggregates was tetrahedral, which allows us to dismiss the occurrence of Zn-sorbed or substituted into crystalline Fe oxyhydroxides, as Zn is octahedral in these species. Second, the low amplitude of the EXAFS signal indicated that the structural order around Zn is limited to a few atomic shells, which suggests that Zn forms a surface complex of the type found on ferrihydrite. Third, the association of Zn with Fe oxyhydroxide was pervasive, because it was detected everywhere throughout the soil matrix mixed with other minerals, either as coatings on willemite and phosphate grains, or as aggregates in association with phyllosilicate in the finely divided matrix. Similar results were reported by Manceau et al. (2002b), who contended that, owing to its nanophase nature, ferrihydrite occurs as a 'background' species consistently throughout soil matrices. Therefore, the tetrahedral coordination of Zn in association with iron oxyhydroxide in the soil, the pervasive distribution of this constituent and the high metal sorption capacity of ferrihydrite in general (Davis and Kent, 1990; Spadini et al., 1994; Cornell and Schwertmann, 1996; Hochella et al., 1999), all support Zn-sorbed ferrihydrite as the most likely Zn-containing ferric phase in the soil.

Zn phosphate, modeled here with Zn phosphate dihydrate, is the second major form of Zn. Its occurrence was determined unambiguously by μ -EXAFS and supported by SEM-EDS. Zn phosphate was observed previously in a contaminated soil amended with phosphate, and on the root surface of *Agrostis tenuis* grown on this amended soil (Cotter-Howells and Caporn, 1996), and also in a P-rich Zn-contaminated sediment vegetated by graminaceous plants (*Agrostis tenuis* and *Festuca rubra*) (Panfili et al., 2005). Consequently, the occurrence of this species in our highly fertilized agricultural soil is not surprising especially with respect to the elevated phosphorus content ($[P_2O_5] = 0.6\%$) and excess of

zinc ($[Zn] = 1103 \text{ mg/kg}$). The exact nature of Zn bound in the phosphate phase could not be established precisely, but the featured shape of its EXAFS spectrum suggests that this phase is relatively crystalline. Our results also suggest that this form is inorganic.

Zn-containing phyllosilicate is the third major form of Zn. Its trioctahedral nature was established by target transformation. The high amplitude of the EXAFS signal from this species is a strong indication that Zn is incorporated in the phyllosilicate structure, and does not form a surface complex on layer edges. This result, together with the fact that the octahedral sheets contain on average about as many Zn as Mg atoms, suggests that Zn did not sorb on the surface of preexisting phyllosilicate particles, but instead that this species resulted from the coprecipitation of dissolved zinc and silica. This hypothesis is consistent with the sandy nature of the soil ($[SiO_2] = 79.6\%$, and 69 wt.% of sand fraction), since phyllosilicate readily precipitates when a dissolved metal is in contact with quartz and silica (Manceau et al., 1999), and also with the low amount of phyllosilicate surface sites available for metal sorption, since the soil does not contain many clay minerals (8 wt.%). Zn-containing trioctahedral phyllosilicate is a common species in soils and oxidized sediments at circumneutral pH, and is a prevalent form of zinc in low-temperature continental settings in temperate climates (Manceau et al., 2000a; Isaure et al., 2002, 2005; Panfili et al., 2005). Here, this species takes up about a quarter of the total molar Zn content.

Willemite (Zn_2SiO_4) is the fourth Zn-species in abundance. It is an anhydrous silicate, which nominally forms at high temperature and, consequently, has been frequently observed in soils and sediments affected by smelting processes (Thiry and Van Oort, 1999; Manceau et al., 2000a; Isaure et al., 2002; Thiry et al., 2002). In this study, the source of willemite is presumably also anthropogenic, and may result either from irrigation with wastewater containing smelter dust particles or from atmospheric fallout. The latter source is most likely since the Pierrelaye land is located near an industrialized area from the Paris suburb. This hypothesis was tested by measuring the heavy metal content in a soil under permanent forest located near the agricultural land of Pierrelaye (Baize et al., 2002). The measured concentrations of Zn (87 mg/kg), Pb (114 mg/kg), and Cu (28 mg/kg) were much lower than in the irrigated fields (Zn 150–3150 mg/kg, Pb 80–668 mg/kg, and Cu 50–390 mg/kg), but still higher than the estimated geochemical background (Zn 7 mg/kg, Pb 7 mg/kg, and Cu 3 mg/kg), therefore suggesting the possibility of an atmospheric input for willemite. Willemite was identified by μ -EXAFS in association with Zn ferrihydrite and Zn phosphate, but not with Zn phyllosilicate. The primary zinc silicate grains of willemite may act as a physical support for the precipitation of the two secondary Zn minerals, but not as a chemically reactive substrate because the weathering of willemite is expected to promote the formation of hydrous sheet silicate.

Gahnite (ZnAl_2O_4), the last of the five species identified in this study, was detected only by μ -EXAFS and was below the detection limit of powder EXAFS ($\sim 10\%$). Gahnite is a Zn spinel typically formed in high temperature metamorphic environments (Hochella et al., 1999). Consistently with the usual natural occurrence of this mineral, anthropogenic gahnite has been described in soils and sediments affected by atmospheric fallout of Zn dusts emitted by smelting activities (Thiry et al., 2002; Isaure et al., 2005; Panfili et al., 2005). However, gahnite was also found in an acid mine drainage site (Hochella et al., 1999), and was reported to form in the laboratory at low temperature during ferrihydrite breakdown reactions in the presence of high concentrations of metals (Cornell, 1988). In this study, gahnite was found fortuitously in a micrometer-sized Zn hot spot, and this observation, together with the concomitance of willemite, lends support to its anthropogenic origin.

4.2. Mechanism of metal solubilization by chelants

4.2.1. EDTA

EDTA strongly binds multivalent cations (MVCs), such as Ca^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} (Table 2). For example, equilibrium thermodynamic calculations show that MVC-containing minerals, such as calcite, ferrihydrite, hydroxylapatite, hopeite, smithsonite, and cerussite, are completely dissolved below pH 9 in contact with 1% excess EDTA (or EDDS), i.e., when the ligand concentration is 1% higher than the total concentration of MVCs in the solid phase. This is because the activity of the free (uncomplexed) ligand decreases the activities of MVCs below the solubility limit of the solid. In our dissolution experiments, it is important to know whether the complexation of MVCs consumed all of the EDTA, because this information provides insight on the main chemical process responsible for the solubilization of metals. If free ligands were present in the suspension, then the extraction of MVCs was kinetically driven, and time-resolved measurements of the aqueous concentration of MVCs can be regarded as representative of the apparent dissolution rate constants of the solid phase(s). If the ligand were totally saturated with MVCs, then one or several MVC-containing phases dissolved rapidly, and values of $[\text{MVC}]_{\text{aq}}$ were in equilibrium with the MVC-supplying phase(s). In this case, the nature of the dissolving phase(s) can be predicted from solubility constants, MVC hydrolysis constants, and ligand-MVC complexation constants. However, this approach requires that the unknown MVC-supplying phases and chemical processes, such as complexation with competing ligands, desorption, and cation exchange, are not significant. These other processes can be ignored at high $[\text{ligand}]/[\text{solid}]$ concentration ratios, particularly in our cycling experiments, since the chelant was repeatedly renewed.

In the cycling EDTA extraction experiment, 200 g/L solid was exposed five times for 24 h each time to fresh 7 mmol/L $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$. The sum of the MVCs concentrations ($\Sigma[\text{MVC}]$) in the supernatant was nearly constant (i.e., 6.58-7.12 mmol/L, Table 4) in each of the first four cycles, which suggests that the EDTA ligand was saturated with MVCs each time, and thus that dissolution occurred at equilibrium with respect to the solid phases. Ca was the predominant MVC leachate, and its aqueous concentration increased from 4.67 mmol/L in the 1st cycle to 6.41 mmol/L in the 4th cycle. $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$, $[\text{Pb}]_{\text{aq}}$, and $[\text{Cu}]_{\text{aq}}$ concomitantly decreased, but not enough to compensate the Ca variation; so the $[\text{Ca}]_{\text{aq}}$ to $\Sigma[\text{MVC}]$ ratio increased from 66% in the 1st cycle to 92% in the 4th cycle. This indicates that Ca was more available than other divalent metals and could satisfy the constant EDTA demand. All these results suggest that EDTA was in equilibrium with a Ca-supplying phase, which is likely calcite since this mineral is the second most abundant mineral species after quartz according to XRD data. The total amount of Ca solubilized by EDTA after five extraction cycles corresponds to an equivalent concentration of calcite of 12-14 mg/g.

$[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ was relatively constant from one cycle to another, indicating that Fe, similarly to Ca, was available on EDTA demand, i.e. in equilibrium with an Fe solid phase. More precisely, $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ decreased slightly from 2.48 to 2.31 mmol/L between the 1st and 2nd cycle (Table 4). From the 4th to the 5th cycle, $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ increased significantly by 0.06 mmol/L (from 0.235 to 0.293 mmol/L), whereas $[\text{Ca}]_{\text{aq}}$ concomitantly decreased by 0.7 mmol/L (from 6.41 to 5.71 mmol/L). This finding suggests that Ca became less available than Fe in the 5th cycle, and that the amount of the Fe-EDTA complex in solution increased relative to that of the Ca-EDTA.

Since $[\text{Ca}]_{\text{aq}}$ and $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ as well as the Ca- and Fe-supplying solids are in equilibrium with EDTA, $[\text{Ca}]_{\text{aq}}$ and $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ can be predicted from equilibrium speciation calculation. This calculation was performed with the Phreeqc for Windows code (Parkhurst and Appelo, 1999) using the Phreeqc formatted V8.R6 Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) database (Wolery, 1992), unless otherwise noted. Metal-EDTA complexation constants were taken from Smith and Martell (1976) and from the more recent NIST database (Martell and Smith, 2004). The Phreeqc script is presented in electronic access EA. From this calculation, a 7 mmol/L $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ solution in the presence of excess calcite and ferrihydrite equilibrates theoretically at pH 7.0 and at a molar ratio $\text{MR}_{\text{Ca}} = [\text{Ca}]_{\text{aq}}/([\text{Ca}]_{\text{aq}} + [\text{Fe}]_{\text{aq}}) = 80\%$. When forcing the system to the experimental pH value measured in the 1st cycle (pH 7.5), calculated MR_{Ca} equals 95.5%, which matches the experimental MR_{Ca} values for all cycles (95.0-96.5%, Table 4). Thus, our equilibrium model and data both predict a Ca over Fe dominance in solution for all extraction cycles. Note that the MR_{Ca} parameter is a good indicator of the equilibrium state of the system, because its value is essentially independent of the presence or absence of other dissolved MVCs. Also, and consistently with the

assumed equilibrium condition, speciation calculations showed that 99.999% of EDTA was complexed to MVCs and, conversely, that most of the MVCs were complexed to EDTA.

The ferrihydrite solubility constant which yielded the best agreement between experiment and theory was that given by Dzombak and Morel (1990) for hydrous ferric oxide



The solubility constant given for aged $\text{FeOH}_{3(\text{s})}$ in the NIST database ($\log K_{\text{s-Fe}} = 2.69$; Martell and Smith, 2004) compares closely. Using the NIST value for non-aged $\text{FeOH}_{3(\text{s})}$ ($\log K_{\text{s-Fe}} = 3.39$) decreased MR_{Ca} to 75%, consistently with the lower solubility of aged vs. non-aged ferrihydrite. Using the solubility constants given for ferrihydrite in the Minteq database ($\log K_{\text{s-Fe}} = 4.89$; Jerry et al., 1991) and in the Phreeqc built-in LLNL V8.R6 database ($\log K_{\text{s-Fe}} = 5.66$, Wolery, 1992) decreased MR_{Ca} to 31 and 25%, respectively, thus predicting an Fe over Ca dominance, in contrast to the data. None of the solubility constants available for well crystalline Fe oxides described the data. For example, using the solubility constant for goethite ($\log K_{\text{s-Fe}} = 0.491$, NIST database) resulted in $\text{MR}_{\text{Ca}} = 99.9\%$ after the first extraction, that is predicting a $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ value of 3.5 $\mu\text{mol/L}$ instead of 248 $\mu\text{mol/L}$. Similar, or even lower $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ values, were obtained with other well crystalline Fe oxides, indicating that the Fe availability in the cycling EDTA extraction experiments was not controlled by crystallized Fe oxide. The ferrihydrite dissolved during the first extraction cycle did not release Zn since the proportion of the Zn-ferrihydrite species, as determined by EXAFS spectroscopy, remained essentially the same before and after chemical treatment. Thus, Zn ferrihydrite seems less soluble than ferrihydrite that does not bear Zn. Since the studied soil has been irrigated by sewage water for 100 years, Zn may be occluded in fine-grained crystalline aged ferrihydrite.

Aqueous concentrations of Cu, Zn, Pb, and P decreased with the increasing number of cycles. This result suggests that these metals are co-associated with phosphate, in agreement with EXAFS and SXRF results. This hypothesis was tested by calculating the aqueous concentration of Zn-EDTA at pH 7.5 and 7 mmol/L EDTA in a quaternary system comprising calcite, ferrihydrite, gibbsite and one of the following phosphate minerals: hopeite ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), scholzite ($\text{Zn}_2\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$), spencerite ($\text{Zn}_4(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$), Zn-pyromorphite ($\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), ortarbuttite ($\text{Zn}_2(\text{PO}_4)\text{OH}$). We used the same solubility constants as Panfili et al. (2005) for the Zn phosphate compounds. The percentage of EDTA complexed to Zn in the five systems was as high as 98.8, 99.7, 99.5, 98.7, and 76%, respectively. This means that EDTA has a much stronger affinity for Zn than for the other major MVCs in equilibrium with the solid phases of the mixture (i.e., Ca, Fe, Al). Also, in all explored systems calculated $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$ was higher than the total Zn content in the soil (17 $\mu\text{mol/g}$

in the soil, i.e., 3.4 mmol/L in the 200 g/L suspension), which means that when in equilibrium with calcite, ferrihydrite and gibbsite, EDTA can theoretically dissolve all tested Zn phosphate minerals. Thus, our thermodynamic calculations support the quantitative solubilization of the Zn-phosphate species revealed by EXAFS spectroscopy. Zn-kerolite was the only tested Zn phase that was thermodynamically stable under our experimental conditions. This result is consistent with EXAFS results, since this phase was shown to be essentially inert to EDTA.

4.2.2. EDDS

Although the same extraction conditions were applied for EDTA and EDDS, i.e., 7 mmol/L chelant concentration and 200 g/L solid content, marked differences were observed in the major element composition of the supernatants. In the EDDS experiment, $[Ca]_{aq}$ (2.53-2.93 mmol/L) was typically half that in the EDTA experiment (Table 4), but $[Ca]_{aq}$ remained constant in both cases upon renewing the extracting solution, indicating that Ca was always 'available on demand'. In contrast, $[Fe]_{aq}$ (1.0-1.8 mmol/L) and $[Al]_{aq}$ (0.32-1.25 mmol/L) were higher with EDDS than with EDTA (0.23-0.29 mmol/L, and 21-39 μ mol/L, respectively). Another difference is the decrease of the amount of Fe and Al solubilized with EDDS upon renewing the chelant, which is an indication of the progressive exhaustion of the Fe and Al supplies. Few differences were observed with heavy metals, although slightly more were extracted with EDDS than with EDTA: $[Zn]_{aq}$ ranged from 0.12 to 1.43 mmol/L with EDDS and from 0.10 to 2.27 mmol/L with EDTA, $[Cu]_{aq}$ from 0.029 to 0.67 mmol/L with EDDS and from 0.031 to 0.46 mmol/L with EDTA, and $[Pb]_{aq}$ from 0.032 to 0.17 mmol/L with EDDS and from 0.021 to 0.13 mmol/L with EDTA. Also, the metal concentrations always decreased with the number of cycles. Consequently, metal extraction data may not be interpreted in terms of metal-ligand complexation strength (or metal selectivity) under equilibrium conditions.

Phreeqc simulations were performed with 7 mmol/L EDDS at pH 7.5 (the experimental value) assuming, first, an excess of calcite, ferrihydrite and gibbsite only. Calculated $[Ca]_{aq}$ (2.5 mmol/L) compared well with measured $[Ca]_{aq}$ (2.5-2.9 mmol/L), with the majority of calculated $[Ca]_{aq}$ being uncomplexed (2.2 mmol/L). Similarly to Ca, our calculation predicted that most of the EDDS (89%) remained uncomplexed in solution, in contrast to the EDTA experiment. Thus, EDDS appears to be a much weaker Ca complexant than EDTA, consistent with the six orders of magnitude difference between the Ca-EDDS and Ca-EDTA complexation constants (Martell and Smith, 2004). In strong contrast with Ca, but also in agreement with log K values, EDDS was found to bind metals strongly, in particular Zn, as 99.99 and 94% of EDDS was complexed to Zn and Pb, respectively, when hopeite (Zn) and cerussite (Pb) were added in excess to the three previous solids. Therefore, EDDS and

EDTA have mostly comparable extraction capabilities for heavy metals, but not for calcium. This difference of binding properties between EDDS and EDTA may explain why metal extraction levels were significantly higher with the first complexant since part of the EDTA in contact with the soil may have been complexed by Ca, whose content is relatively high ($[CaO] = 3.4\%$) (Fig. 1).

In field conditions, EDTA and EDDS will be less concentrated than in our experimental setup. To test their relative efficiency toward metal extraction in dilute systems, and more especially toward Zn from hopeite, another simulation was performed for the same quaternary system at 10^{-5} mol/L ligand concentration. At this concentration, EDTA and EDDS still are excellent metal extractants from solid phases since 99.99% of EDDS and 99.95% of EDTA were complexed to Zn. In the same conditions, only 1.7% of citrate was complexed to Zn. However, it will be seen below that citrate, in combination with soil microorganisms, may dissolve reducible phases, such as Fe oxyhydroxides, thereby releasing associated trace metals. Therefore, the relative affinity of EDDS and EDTA, on one hand, and of citrate, on the other hand, also depends on the nature of the host phase, and there may be cases in which citrate is a better extractant than the other two chelants.

Two indirect lines of evidence support the hypothesis that EDDS may be a reductant under certain conditions, although to a lesser extent than citrate. The first comes from the difference between the measured (1.0-1.8 mmol/L) and the calculated (0.4 mmol/L) concentrations of Fe in the ternary model system. Second is the fact that EDDS always extracted more metals than EDTA, as apparent in Fig. 1. These two observations suggest that EDDS is a weak Fe(III) reducing reagent. If our hypothesis is valid, then EDDS can extract trace metals by two complementary mechanisms: complexation of metals contained in non-reducible host phases, and reductive dissolution of metal-containing host phases. Since EDDS is rapidly degraded in soils (Vandevivere et al., 2001b), one may infer that its (bio)degradation may be coupled with Fe reduction.

4.2.3. Citrate

Equilibrium calculations showed that citrate is a weaker ligand than EDTA and EDDS, and does not preferentially extract heavy metals from the solid phases. Under equilibrium conditions at pH 7.8 (i.e., the experimental value of the 1st citrate cycle), none of the tested solid phases (calcite, ferrihydrite, gibbsite, metal phosphate) was completely dissolved when reacted separately with 0.1 mol/L citrate and assuming an MVC concentration of 0.05 mol/L in the solid; i.e., a 100% excess of citrate. The same calculation, but with the presence of an excess of calcite, ferrihydrite and gibbsite (i.e., ternary system) yielded $[Ca]_{aq} = 21$ mmol/L, $[Fe]_{aq} = 0.11$ μ mol/L, and $[Al]_{aq} = 11$ mmol/L. As much as 43% of the initial citrate remained

free. The effect of citrate on a particular MVC-containing phase can be predicted by simulating a system in which only the MVC-supplying phase is in excess. For example, a 0.1 mol/L suspension of citrate at pH 7.8 containing only hopeite as the solid phase yielded $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$ (or Zn-citrate) = 2.5 mmol/L, meaning that only 2.5% of citrate was complexed to Zn. Adding an excess of calcite, gibbsite and ferrihydrite to this suspension reduced the free ligand concentration from 97.5 to 41%, and also decreased $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$ from 2.5 to 1.3 mmol/L. The same general effect was observed with other Zn-containing phases. These calculations show that citrate does not dissolve selectively metal-containing phases. More generally, our calculations showed that at equilibrium with a mixture of solid phases, citrate prefers calcite and ferrihydrite to the metalliferous phases. The lack of citrate selectivity for metal-containing phases contrasts with EDTA and EDDS. However, in the conditions of our experiments the dissolution of metal phases may have been complete since citrate was in large excess relative to the total amount of Cu, Zn, and Pb.

In the cycling citrate extraction experiment, Ca was, in agreement with equilibrium calculations, the most extracted MVC (Table 4). In the 1st cycle, $[\text{Ca}]_{\text{aq}} = 13.7$ mmol/L, a value slightly lower than the theoretical value (21 mmol/L) at pH 7.8 (i.e., fixed to the experimental value) and in the presence of an excess of calcite, ferrihydrite and gibbsite. The solubility of Ca continuously decreased afterwards from the 2nd to 5th cycle. After the 1st cycle, $[\text{Ca}]_{\text{aq}}$ corresponded to an extracted Ca amount of 172 $\mu\text{mol Ca/g soil}$, which is more than the total amount of Ca extracted in all the five EDTA (144 $\mu\text{mol Ca/g soil}$) and EDDS (67 $\mu\text{mol Ca/g soil}$) cycles. The higher amount of extracted Ca is mainly due to the higher amount of citrate used here compared to the EDTA and EDDS experiments (Table 1). Fe was the second highest MVC extracted by citrate (Table 4). $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ increased slightly from the 1st (2.27 mmol/L) to the 2nd (2.57 mmol/L) cycle, due probably to an increase of free citrate concentration in the 2nd cycle as a result of the concomitant decrease of Ca-citrate. Afterwards, $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ decreased from 2.57 (2nd) to 0.287 (5th) mmol/L, indicating that the Fe availability decreased. The declining availability of these elements suggests that only the most easily dissolved phases (e.g., fine-grained and amorphous phases) are removed. Experimental $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ values measured in the 1st and 2nd cycles were inconsistent with the predicted value from equilibrium calculations (0.05 $\mu\text{mol/L}$). Substitution of the solubility constant for Fe oxide that best-fitted the EDTA data ($\log K_{\text{s-Fe}} = 2.5$) by the solubility constant from the Minteq database ($\log K_{\text{s-Fe}} = 4.9$) raised the calculated $[\text{Fe}]_{\text{aq}}$ to 20 $\mu\text{mol/L}$ but, still, did not account for the experimental concentration. In fact, the predicted and experimental values are so different that a solubilization mechanism other than Fe(III)-ligand equilibrium complexation must have occurred, such as reduction of Fe(III) to Fe(II).

In the presence of a reducing agent, such as dithionite, poorly and well crystallized iron oxides are efficiently and selectively dissolved by citrate, whose role is to complex Fe(II)

and to prevent its readsorption on reactive mineral surfaces (Kostka and Luther, 1994; Soulier et al., 1994; Trolard et al., 1995). Since our dissolution experiments were performed in a closed reactor, anoxic conditions may have been created by the metabolic activity of some common O_2 -scavenging bacteria, such as *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* or *Pseudomonas stutzer* (Straub and Schink, 2004).

Experimental $[Al]_{aq}$ measured at the end of the 1st citrate cycle (0.85 mmol/L) is slightly below the calculated equilibrium concentration (2.8 mmol/L) for the calcite–ferrihydrite–gibbsite ternary system. Given that $[Al]_{aq}$ decreased in the following cycles along with other MVCs, this result suggests that the Al-supplying solid is soluble in citrate.

Of the heavy metals extracted by citrate, Zn is the most prevalent (Table 4). As for EDTA, Zn and P followed the same solubilization pattern with repeated citrate extraction. The parallel dissolution of Zn and P is consistent with the EXAFS results, which showed that the Zn phosphate component was quantitatively dissolved after the 1st citrate extraction cycle. The $[Zn]_{aq}/[P]_{aq}$ ratio after the 1st cycle (0.4) is lower than the stoichiometric Zn/P ratio of our Zn phosphate dihydrate model compound. This discrepancy can be explained by the fact that citrate lacks selectivity for heavy metals relative to background cations (Table 2). To verify this interpretation, equilibrium speciation calculations were performed for a model citrate solution containing an excess of calcite, ferrihydrite, gibbsite, and Zn speciated as hopeite. The calculated Zn solubility was 1.38 mmol/L, that is 239, 100, and 93% of the amount measured after the 1st extraction cycle with citrate (0.59 mmol/L), EDTA (1.36 mmol/L), and EDDS (1.43 mmol/L). These results confirm that in a phase mixture citrate does not dissolve preferentially the metal-containing phases, in contrast to EDTA and EDDS. In our experiment, the Zn phosphate component was dissolved quantitatively during the 1st cycle because citrate was added in excess relative to the metal and background Fe and Ca cations in the soil (Table 1). More generally, results from Fig. 1 may give the false impression that citrate is as efficient as EDTA and EDDS in extracting metals. In fact, the similar extractability of metals with the three ligands is due to the fact that the chemical reactors contained 14 times more citrate than EDTA and EDDS (i.e., 100 vs. 7 mmol/L), and a solid to solution ratio 2.5 times lower than that in the citrate reactor (80 vs. 200 g/L). Therefore, the lower affinity of citrate for metals was compensated by increasing its concentration and decreasing the amount of solid in the reactor.

4.3. Environmental implications

The extraction levels measured in the desorption experiments indicated that significant removal of heavy metals could be obtained on a time scale of hours. Therefore, adding chelating agents to the Pierrelaye soil is a possible remediation approach. The use of

EDDS and citrate, and especially of citrate whose cost is relatively low, is attractive because these molecules and their metal complexes are easily biodegraded and, therefore, do not have long-lasting effects (Dodge and Francis, 1994; Huang et al., 1998; Vandevivere et al., 2001b). Citrate rapidly dissociates to carbon dioxide and water, thus preventing the dispersion of its metal complexes into surface and ground waters. However, the biodegradability of metal-citrate complexes highly depends on their nature. For example, the tridentate complexes of citrate with Cu and Pb are more resistant to bacterial degradation than the bidentate complexes with Fe and Ni (Francis et al., 1992). Note that the longer life-time of some complexes may be an advantage in the treatment of certain locations such as wastewater plants, because it may allow the recovery of the metal. Finally, both EDDS and citrate are classified as non-hazardous chemicals to humans and the environment.

In contrast, and despite its high mobilizing capacity and selectivity for heavy metals, EDTA is not suitable for remediation because of its slow biodegradability (Bolton et al., 1993; Regmi et al., 1996; Egli, 2001). It has been reported that EDTA and its complexes can persist in the environment over several years, with heavy metal-EDTA complexes, including Zn, Cu, and Pb, being the most persistent (Nowack et al., 1997; Satroutdinov et al., 2000). Also, conventional biological and chemical wastewater treatments are not efficient for degrading EDTA-containing effluents (Gardiner, 1976; Hinck et al., 1997). In addition to being weakly biodegraded, EDTA has been reported to be toxic to photosynthetic organisms, inhibiting cellular division, chlorophyll synthesis and algal biomass production (Dufkova, 1984). In an experiment on living rat kidney cells, Hugenschmidt et al. (1993) showed that at concentrations of $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ lower than 100 μM , which was less than the concentration required to chelate all of the free Ca^{2+} ions in the growth medium, many cells died, and cell division was severely impaired.

5. Concluding remarks

This study documents the usefulness of combining state-of-the-art X-ray techniques, modern EXAFS data reduction (i.e., PCA and LCF), chemical extractions, and thermodynamic modeling to identify and quantify the solid state forms of metals in contaminated soil, and to evaluate the modification of metal speciation upon adding organic ligands. Zinc is predominantly, and almost evenly, bound to iron oxyhydroxide (~30%), phosphate (~28%), and phyllosilicate (~24%) in the studied near-neutral (pH 6.5-7.0) truck farming soil contaminated by sewage irrigation. Thus, these three secondary phases control the mobility and, in particular the bioavailability, of zinc in the field. As much as ~40% of the soil Zn was solubilized with citrate, EDDS, and EDTA in a few hours of reaction time, and up

to ~80% with citrate when the extracting solution was renewed. Therefore, citrate, which is relatively cheap and easily biodegraded, may be used to remediate this soil. EXAFS revealed that the three chelants dissolved Zn phosphate selectively in the laboratory after 24 h of contact time. The other coexisting zinc species were either not or else only moderately affected by a single extraction step, but more solubilized when the chelating solution is renewed. This study also shows that there is no direct correlation between the amount of metal extracted and the metal-ligand thermodynamical binding constant.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jean-Louis Hazemann, Olivier Proux, and Jean-Jacques Menthonnex for their assistance during EXAFS measurements on the FAME beamline at ESRF, and to Sébastien Pairis for his assistance in collecting SEM-EDS data. Géraldine Sarret is acknowledged for insightful discussions, and two anonymous reviewers and Dr. A.C. Scheinost for their constructive remarks. We also thank Martine Lanson and Nicolas Geoffroy for their analytical and technical assistance. EDDS was kindly provided by Sigma–Aldrich Fluka. The CNRS, which supports the French-CRG program at ESRF, and the ALS are acknowledged for the provision of beamtime. Finally, we thank *Phytorestore* and ANRT for fellowship support of T.A.K. during this study, and also the Region Ile-de-France for partial support of this research.

Associate editor: Garrison Sposito

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.gca.2006.02.006.

Supporting Information. Phreeqc script for the calculation of Zn, Pb and Cu solubilities in presence of excess calcite, ferrihydrite, and gibbsite, and 0.007 mol/L EDTA.

Phreeqc EDTA speciation script (for LLNL Database)

SOLUTION_MASTER_SPECIES

#Element species Alk gfw gfw_of_element

Edta Edta-4 0 288 288

Phases

Fix_ph ; $H^+ = H^+$; log_k 0 # Virtual fix pH phase

Zn-Hydrotalcite ; $Zn_2Al(CO_3)0.5(OH)_6 + 6.5 H^+ = 2 Zn^{+2} + Al^{+3} + 0.5 HCO_3^- + 6 H_2O$; log_k 27.0

Ferrihydrite ; $Fe(OH)_3 + 3 H^+ = 1 Fe^{+3} + 3 H_2O$; log_k 2.5

ZnKerolite300 ; $Si_4Zn_3O_{10}(OH)_2 + 6 H^+ = 3 Zn^{+2} + 4 SiO_2 + 4 H_2O$; logk = 8

ZnKerolite135 ; $Si_4Zn_{1.35}Mg_{1.65}O_{10}(OH)_2 + 6 H^+ = 1.35 Zn^{+2} + 1.65 Mg^{+2} + 4 SiO_2 + 4 H_2O$; logk = 8

Scholzite ; $Zn_2Ca(PO_4)_2(H_2O)_2 + 2 H^+ = 2 Zn^{+2} + Ca^{+2} + 2 HPO_4^{-2} + 2 H_2O$; log_k -9.4564

Spencerite ; $Zn_4(PO_4)_2(OH)_2 = 4 Zn^{+2} + 2 HPO_4^{-2} - 4 H^+ + 2 H_2O$; log_k -0.1662

Tarbuttite ; $Zn_2(PO_4)OH + 2 H^+ = 2 Zn^{+2} + HPO_4^{-2} + H_2O$; log_k -0.2831

Zn_Pyromorphite ; $Zn_5(PO_4)_3(OH) = 5 Zn^{+2} + 3 HPO_4^{-2} - 4 H^+ + H_2O$; log_k -12.1395

SOLUTION_SPECIES

#Edta Acid-base

Edta-4 = Edta-4; log_k = 0

Edta-4 + H^+ = HEdta-3; log_k = 10.948

Edta-4 + 2 H^+ = H₂Edta-2; log_k = 17.221

Edta-4 + 3 H^+ = H₃Edta-; log_k = 20.338

Edta-4 + 4 H^+ = H₄Edta; log_k = 22.552

Edta-4 + 5 H^+ = H₅Edta+; log_k = 24.052

#Edta-Cu

Edta-4 + Cu^{+2} = CuEdta-2; log_k = 20.489

Edta-4 + H^+ + Cu^{+2} = CuHEdta-1; log_k = 24.016

Edta-4 + 2 H^+ + Cu^{+2} = CuH₂Edta; log_k = 26.223

Edta-4 + Cu^{+2} + H_2O - H^+ = CuOHEdta-3; log_k = 8.445

#Edta-Zn

Edta-4 + Zn^{+2} = ZnEdta-2; log_k = 18.0

Edta-4 + H^+ + Zn^{+2} = ZnHEdta-1; log_k = 21.427

Edta-4 + 2 H^+ + Zn^{+2} = ZnH₂Edta; log_k = 22.830

Edta-4 + Zn^{+2} + H_2O - H^+ = ZnOHEdta-3; log_k = 5.756

#Edta-FeIII

Edta-4 + Fe^{+3} = FeEdta-1; log_k = 27.663

Edta-4 + H^+ + Fe^{+3} = FeHEdta; log_k = 29.176

Edta-4 + Fe^{+3} + H_2O - H^+ = FeOHEdta-2; log_k = 19.843

2 Edta-4 + 2 Fe^{+3} + 2 H_2O - 2 H^+ = Fe₂(OH)₂Edta₂-4; log_k = 41.673

#Edta-Ca

Edta-4 + Ca^{+2} = CaEdta-2; log_k = 12.439

Edta-4 + H^+ + Ca^{+2} = CaHEdta-1; log_k = 15.966

#Edta-Al

Edta-4 + Al+3 = AlEdta-1; log_k = 18.9629
 Edta-4 + H+ + Al+3 = AlHEdta; log_k = 21.77648
 Edta-4 + Al+3 + H2O - H+ = AlOHEdta-2; log_k = 10.28642
 Edta-4 + Al+3 + 2 H2O - 2 H+ = Al(OH)2Edta-3; log_k = 1.68502

#Edta-Pb

Edta-4 + Pb+2 = PbEdta-2; log_k = 19.70860
 Edta-4 + H+ + Pb+2 = PbHEdta-1; log_k = 22.53575
 Edta-4 + 2 H+ + Pb+2 = PbH2Edta; log_k = 24.43891
 Edta-4 + 3 H+ + Pb+2 = PbH3Edta+1; log_k = 25.63891

SOLUTION 1 ; -units mol/kgw # kgw is kg water

pH 9 charge # calculate equilibrium pH from charge balanced solution

Edta 0.007 as H2Edta-2 ; Na 0.014 # EDTA total concentration

added as charge balanced NaH2EDTA

equilibrium_phases 1 # equilibrate solution with phases listed below

Ferrihydrite 0 1 # excess Ferrihydrite ;

'O' is target sat.indices, '1' is mol/L tot.solid conc.

Calcite 0 1 # excess Calcite

Gibbsite 0 1 # excess Gibbsite

#Hydroxylapatite 6 1 # saturation indices set to 6 for excess Hydroxylapatite

#Hopeite 0 1 # excess Hopeite

Fix_ph -7.5 NaOH # From equilibrium pH reach pH 7.5 by adding NaOH

in case of non-convergence change NaOH to HCl

#SiO2(am) 0 1 # aqueous Si(OH)4 fixed by amorphous SiO2 solubility

#CO2(g) -3.5 10 # Open reactor condition: pCO2 fixed to 10^{-3.5} atm.;

CO2 reservoir is 10 mol/L ;

END

References

- Acar, Y.B., Gale, R.J., 1995. Electrokinetic remediation : basic and technology status. *J. Hazard. Mater.* 40, 117–137.
- Anderson, C.W.N., Brooks, R.R., Stewart, R.B., Simcock, R., 1998. Harvesting a crop of gold in plants. *Nature* 395, 553–554.
- Baize, D., 2000. Teneurs en métaux lourds dans les sols français. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 22, 39–54.
- Baize, D., Lamy, I., Van Oort, F., Dere, C., Chaussod, R., Sappin-Didier, V., Bermond, A., Bourgeois, S., Schmitt, C., Schwartz, C., 2002. 100 years spreading of urban waste

- water on market-garden soils close to Paris (France) : subsequent impacts and hazards. In: *17th World Congress of Soil Science*, Bangkok, Thailand, pp. 1–10.
- Bassi, R., Prasher, S.O., Simpson, B.K., 2000. Extraction of metals from a contaminated sandy soil using citric acid. *Environ. Prog.* 19, 275–282.
- Blais, J.F., Tyagy, R.D., Auclair, J.C., 1992. Bioleaching of metals from sewage sludge by sulfur-oxidizing bacteria. *J. Environ. Eng. ASCE* 118, 690–707.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Raskin, Y., 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian Mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 31, 860–865.
- Blaylock, M.J., 2000. Field demonstration of phytoremediation of lead contaminated soils. In: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publ., Boca Raton, FL, pp. 1–12.
- Bolton Jr., H., Li, S.W., Workman, D.J., Girvin, D.C., 1993. Biodegradation of synthetic chelates in subsurface sediments from the southeast coastal plain. *J. Environ. Qual.* 22, 125–132.
- Buatier, M.D., Sobanska, S., Elsass, F., 2001. TEM-EDX investigation on Zn- and Pb-contaminated soils. *Appl. Geochem.* 16, 1165–1177.
- Calmano, W., Mangold, S., Welter, E., 2001. An XAFS investigation of the artefacts caused by sequential extraction analyses of Pb-contaminated soils. *Fres. J. Anal. Chem.* 371, 823–830.
- Cline, S.R., Reed, B.R., 1995. Lead removal from soils via bench-scale soil washing techniques. *J. Environ. Eng. ASCE* 121, 700–705.
- Cooper, E.M., Sims, J.T., Cunningham, S.D., Huang, J.W., Berti, W.R., 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 28, 1709–1719.
- Cornell, R.M., 1988. The influence of some divalent cations on the transformation of ferrihydrite to more crystalline products. *Clay Minerals* 23, 329–332.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U., 1996. *The Irons Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH Publishers, New York.
- Cotter-Howells, J., Caporn, S., 1996. Remediation of contaminated land by formation of heavy metal phosphates. *Appl. Geochem.* 11, 335–342.
- Cotter-Howells, J.D., Champness, P.E., Charnock, J.M., 1999. Mineralogy of lead-phosphorus grains in the roots of *Agrostis capillaris* L. by ATEM and EXAFS. *Mineral Mag.* 63, 777–789.
- Cotter-Howells, J.D., Champness, P.E., Charnock, J.M., Patrick, R.A.D., 1994. Identification of pyromorphite in mine-waste contaminated soils by ATEM and EXAFS. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 393–402.

- Cunningham, S.D., Berti, W.R., 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. *In Vitro Cell. Dev. B* 29, 207–212.
- Davis, J.A., Kent, D.B., 1990. Surface complexation modeling in aqueous geochemistry. In: Hochella, M.F., White, A. (Eds.), *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 23: *Mineral Water Interface Geochemistry*. Mineralogical Society of America, Washington, DC, pp. 177–260.
- Dodge, C.J., Francis, A.J., 1994. Photodegradation of uranium–citrate complex with uranium recovery. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3062–3067.
- Dufková, V., 1984. EDTA in algal culture media. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67, 479–492.
- Dzombak, D.A., Morel, M.M.F., 1990. *Surface Complexation Modeling*. John Wiley & Sons, New York.
- Ebbs, S.D., Lasat, M.M., Brady, D.J., Cornish, J., Gordon, R., Kochian, L.V., 1997. Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 26, 1424–1430.
- Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. Technol.* 32, 802–806.
- Ebbs, S.D., Norvell, W.A., Kochian, L.V., 1998. The effect of acidification and chelating agents on the solubilization of uranium from contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 27, 1486–1494.
- Egli, T., 2001. Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 89–97.
- Elliott, H.A., Brown, G.A., 1989. Comparative evaluation of NTA and EDTA for extractive decontamination of Pb-polluted soils. *Water, Air, Soil Pollut.* 45, 361–369.
- Foster, A.L., Brown, G.E., Tingle, T.N., Parks, G.A., 1998. Quantitative arsenic speciation in mine tailings using X-ray absorption spectroscopy. *Am. Miner.* 83, 553–568.
- Francis, A.J., Dodge, C.J., Gillow, J.B., 1992. Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility. *Nature* 356, 140–142.
- Gaillard, J.F., Webb, S.M., Quintana, J.P.G., 2001. Quick X-ray absorption spectroscopy for determining metal speciation in environmental samples. *J. Synchrotron Rad.* 8, 928–930.
- Gardiner, J., 1976. Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters. *Water Res.* 10, 507–514.
- Ghestem, J.P., Bermond, A., 1998. EDTA extractability of trace metals in polluted soils: A chemical–physical study. *Environ. Technol.* 19, 409–416.

- Grcman, H., Vodnik, D., Velikonja Bolta, S., Lestan, D., 2003. Ethylenediaminedissuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced: Lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 32, 500–506.
- Gruebel, K.A., Davis, J.A., Leckie, J.O., 1988. The feasibility of using sequential extraction techniques for arsenic and selenium in soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 390–397.
- Hansel, C.M., Fendorf, S., Sutton, S., Newville, M., 2001. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impacted aquatic plants. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3863–3868.
- Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M., Ransom, M.D., 2000. In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4614–4619.
- Hinck, M.L., Ferguson, J.F., Puhakka, J.A., 1997. Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation. *Water Sci. Technol.* 35, 25–31.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: Gobran, G.R., Wenzel, W.W., Lombi, E. (Eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press LCC, Boca Raton, Florida, USA, pp. 25–41.
- Hochella, M.F., Moore, J.N., Golla, U., Putnis, A., 1999. A TEM study of samples from acid mine drainage systems: Metal–mineral association with implications for transport. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3395–3406.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R., Cunningham, S.D., 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31, 800–805.
- Huang, J.W.W., Blaylock, M.J., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., 1998. Phytoremediation of uranium contaminated soils: Role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2004–2008.
- Hugenschmidt, S., Planas-Bohne, F., Taylor, D., 1993. On the toxicity of low doses of tetrasodium–ethylenediaminetetraacetate (Na–EDTA) in normal rat kidney (NRK) cells in culture. *Arch. Toxicol.* 67, 76–78.
- Isaure, M.P., Laboudigue, A., Manceau, A., Sarret, G., Tiffreau, C., Trocellier, P., Lamble, G., Hazemann, J.L., Chateigner, D., 2002. Quantitative Zn speciation in a contaminated dredged sediment by μ -PIXE, μ -SXRF, EXAFS spectroscopy and principal component analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 1549–1567.
- Isaure, M.P., Manceau, A., Geoffroy, N., Laboudigue, A., Tamura, N., Marcus, M.A., 2005. Zinc mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 1173–1198.

- Jerry, D.A., Brown, D.S., Novo-Gradac, K.J., 1991. *MINTEQA2/PRODEFA2, a geochemical assessment model for environmental systems: User's manual, version 3.0, US EPA/600/3-91/021 Report*.
- Juillot, F., Morin, G., Ildefonse, P., Trainor, T.P., Benedetti, M., Galois, L., Calas, G., Brown, G.E., 2003. Occurrence of Zn/Al hydrotalcite in smelter-impacted soils from northern France: Evidence from EXAFS spectroscopy and chemical extractions. *Am. Miner.* 88, 509–526.
- Kayser, A., Wenger, K., Keller, A., Attinger, W., Felix, H.R., Gupta, S.K., Schulin, R., 2000. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: The use of NTA and sulfur amendments. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1778–1783.
- Kim, C.S., Bloom, N.S., Rytuba, J.J., Brown, G.E., 2003. Mercury speciation by X-ray absorption fine structure spectroscopy and sequential chemical extractions: A comparison of speciation methods. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5102–5108.
- Kneebone, P.E., O'Day, P.A., Jones, N., Hering, J.G., 2002. Deposition and fate of arsenic in iron- and arsenic-enriched reservoir sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 381–386.
- Kostka, J.E., Luther, G.W., 1994. Partitioning and speciation of solid phase iron in saltmarsh sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 1701–1710.
- La Force, M.J., Fendorf, S., 2000. Solid-phase iron characterization during common selective sequential extractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 1608–1615.
- Linn, J.H., Elliott, H.A., 1988. Mobilization of Cu and Zn in contaminated soil by NTA. *Water, Air, Soil Pollut.* 37, 449–458.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30, 1919–1926.
- Malinowski, E.R., 1991. *Factor Analysis in Chemistry*. John Wiley, New York.
- Manceau, A., Llorca, S., Calas, G., 1987. Crystal chemistry of cobalt and nickel in lithiophorite and asbolane from New Caledonia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 105–113.
- Manceau, A., Boisset, M.C., Sarret, G., Hazemann, J.L., Mench, M., Cambier, P., Prost, R., 1996. Direct determination of lead speciation in contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1540–1552.
- Manceau, A., Chateigner, D., Gates, W.P., 1998. Polarized EXAFS, distance-valence least-squares modeling (DVLS) and quantitative texture analysis approaches to the structural refinement of Garfield nontronite. *Phys. Chem. Miner.* 25, 347–365.
- Manceau, A., Schlegel, M., Nagy, K.L., Charlet, L., 1999. Evidence for the formation of trioctahedral clay upon sorption of Co^{2+} on quartz. *J. Colloid Interf. Sci.* 220, 181–197.

- Manceau, A., Lanson, B., Schlegel, M.L., Harge, J.C., Musso, M., Eybert Berard, L., Hazemann, J.L., Chateigner, D., Lambelle, G.M., 2000a. Quantitative Zn speciation in smelter-contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Am. J. Sci.* 300, 289–343.
- Manceau, A., Schlegel, M.L., Musso, M., Sole, V.A., Gauthier, C., Petit, P.E., Trolard, F., 2000b. Crystal chemistry of trace elements in natural and synthetic goethite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 3643–3661.
- Manceau, A., Tamura, N., Marcus, M.A., MacDowell, A.A., Celestre, R.S., Sublett, R.E., Sposito, G., Padmore, H.A., 2002a. Deciphering Ni sequestration in soil ferromanganese nodules by combining X-ray fluorescence, absorption and diffraction at micrometer scales of resolution. *Am. Miner.* 87, 1494–1499.
- Manceau, A., Marcus, M.A., Tamura, N., 2002b. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In: Fenter, P., Rivers, M., Sturchio, N.C., Sutton, S. (Eds.), *Reviews in Mineralogy and Geochemistry, vol. 49: Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science*. Mineralogical Society of America, Washington, DC, pp. 341–428.
- Manceau, A., Lanson, B., Drits, V.A., 2002c. Structure of heavy metal sorbed birnessite. Part III: Results from powder and polarized EXAFS spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 2639–2663.
- Manceau, A., Tamura, N., Celestre, R.S., MacDowell, A.A., Geoffroy, N., Sposito, G., Padmore, H.A., 2003. Molecular-scale speciation of Zn and Ni in soil ferromanganese nodules from loess soils of the Mississippi basin. *Environ. Sci. Technol.* 37, 75–80.
- Manceau, A., Marcus, M.A., Tamura, N., Proux, O., Geoffroy, N., Lanson, B., 2004. Natural speciation of Zn at the micrometer scale in a clayey soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 2467–2483.
- Manceau, A., Tommaseo, C., Rihs, S., Geoffroy, N., Chateigner, D., Schlegel, M., Tisserand, D., Marcus, M.A., Tamura, N., Chen, Z.S., 2005. Natural speciation of Mn, Ni and Zn at the micrometer scale in a clayey paddy soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 4007–4034.
- Marcus, M.A., MacDowell, A.A., Celestre, R., Manceau, A., Miller, T., Padmore, H.A., Sublett, R.E., 2004. Beamline 10.3.2 at ALS: a hard X-ray microprobe for environmental and materials sciences. *J. Synchrotron Rad.* 11, 239–247.
- Martell, A.E., Smith, R.M., Motekaitis, R.J., 2001. *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 6*. NIST, Gaithersburg, MD, USA.
- Martell, A.E., Smith, R.M., 2004. *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 8.0*. NIST, Gaithersburg, MD, USA.

- McGrath, S.P., 1998. Phytoextraction for soil remediation. In: Brooks, R.R. (Ed.), *Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 261–287.
- Morin, G., Ostergren, J.D., Juillot, F., Ildefonse, P., Calas, G., Brown, G.E., 1999. XAFS determination of the chemical form of lead in smelter-contaminated soils and mine tailings: Importance of adsorption processes. *Am. Miner.* 84, 420–434.
- Morin, G., Juillot, F., Ildefonse, P., Calas, G., Samama, J.C., Chevallier, P., Brown, G.E., 2001. Mineralogy of lead in a soil developed on a Pb-mineralized sandstone (Largentière, France). *Am. Miner.* 86, 92–104.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geol.* 60, 193–207.
- Nachtegaal, N., Marcus, M.A., Sonke, J.E., Vangronsveld, J., Livi, K., van der Lelie, D., Sparks, D.L., 2005. Effects of in situ remediation on the speciation and bioavailability of zinc in a smelter contaminated soil. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 4649–4664.
- Norvell, W.A., 1984. Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1285–1292.
- Nowack, B., Xue, H., Sigg, L., 1997. Influence of natural and anthropogenic ligands on metal transport during infiltration of river water to groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 31, 866–872.
- O'Day, P.A., Carroll, S.A., Waychunas, G.A., 1998. Rock-water interactions controlling zinc, cadmium, and lead concentrations in surface waters and sediments, US Tri-State Mining District. 1. Molecular identification using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 32, 943–955.
- O'Day, P.A., Carroll, S.A., Randall, S., Martinelli, R.E., Anderson, S.L., Jelinski, J., Knezovich, J.P., 2000. Metal speciation and bioavailability in contaminated estuary sediments, Alameda Naval Air Station, California. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3665–3673.
- Ostergren, J.D., Brown, G.E., Parks, G.A., Tingle, T.N., 1999. Quantitative speciation of lead in selected mine tailings from Leadville, CO. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1627–1636.
- Oviedo, C., Rodriguez, J., 2003. EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. *Quim. Nova* 26, 901–905.
- Paktunc, D., Foster, A.L., Laflamme, G., 2003. Speciation and characterization of arsenic in Ketza river mine tailings using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2067–2074.

- Paktunc, D., Foster, A., Heald, S., Laflamme, G., 2004. Speciation and characterization of arsenic in gold ores and cyanidation tailings using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 969–983.
- Panfil, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., Laboudigue, A., Marcus, M.A., Ahamdach, N., Libert, M.F., 2005. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy and principal components analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 2265–2284.
- Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J., 1999. *User's Guide to PHREEQC (Version 2). A Computer Program for Speciation, Batch-reaction, One- Dimensional Transport, and Inverse Geochemical Calculations. US Geological Survey Water-Resources Investigations Report 99-4259.*
- Peters, R.W., 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 66, 151–210.
- Regmi, T., Banerji, S.K., Hong, A., 1996. Biodegradation of chelating agents used for metal removal from contaminated soils. In : *HSRC/WERC Joint Conference on the Environment*, May 21–23, Albuquerque, NM.
- Ressler, T., Wong, J., Roos, J., Smith, I., 2000. Quantitative speciation of Mn-bearing particulates emitted from autos burning (methylcyclopentadienyl) manganese tricarbonyl-added gasolines using XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 34, 950–958.
- Roberts, D.R., Scheinost, A.C., Sparks, D.L., 2002. Zinc speciation in a smelter-contaminated soil profile using bulk and microspectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1742–1750.
- Robinson, B.H., Brooks, R.R., Clothier, B.E., 1999. Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: Potential use for phytomining and phytoremediation. *Ann. Bot.* 84, 689–694.
- Robinson, B.H., Mills, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R., Clothier, B.E., 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant Soil* 227, 301–306.
- Ryan, J.A., Zhang, P., Hesterberg, D.A., Chou, J., Sayers, D.E., 2001. Formation of chloropyromorphite in lead-contaminated soil amended with hydroxyapatite. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3798–3803.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Phys.* 49, 643–668.
- Sarret, G., Manceau, A., Spadini, L., Roux, J.C., Hazemann, J.L., Soldo, Y., Eybert Berard, L., Menthonnex, J.J., 1998. Structural determination of Zn and Pb binding sites in

- Penicillium chrysogenum cell walls by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1648–1655.
- Sarret, G., Vangronsveld, J., Manceau, A., Musso, M., D'Haen, J., Menthonnex, J.J., Hazemann, J.L., 2001. Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2854–2859.
- Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann, J.L., Traverse, A., Marcus, M.A., Manceau, A., 2002. Forms of Zn accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* 130, 1815–1826.
- Sarret, G., Balesdent, J., Bouziri, L., Garnier, J.M., Marcus, M.A., Geoffroy, N., Panfili, F., Manceau, A., 2004. Zn speciation in the organic horizon of a contaminated soil by micro-X-ray fluorescence, micro- and powder-EXAFS spectroscopy, and isotopic dilution. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2792–2801.
- Satroutdinov, A.D., Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Witschel, M., Minkevich, I.G., Eroshin, V.K., Egli, T., 2000. Degradation of metal–EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1715–1720.
- Savage, K.S., Tingle, T.N., O'Day, P.A., Waychunas, G.A., Bird, D.K., 2000. Arsenic speciation in pyrite and secondary weathering phases, Mother Lode Gold District, Tuolumne County, California. *Appl. Geochem.* 15, 1219–1244.
- Scheinost, A.C., Kretzschmar, R., Pfister, S., 2002. Combining selective sequential extractions, X-ray absorption spectroscopy, and principal component analysis for quantitative zinc speciation in soil. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5021–5028.
- Schlegel, M.L., Manceau, A., Charlet, L., 1997. EXAFS study of Zn and ZnEDTA sorption at the goethite (α -FeOOH)/water interface. *J. Phys. IV* 7, 823–824.
- Schlegel, M.L., Manceau, A., Charlet, L., Hazemann, J.L., 2001a. Adsorption mechanisms of Zn on hectorite as a function of time, pH, and ionic strength. *Am. J. Sci.* 301, 798–830.
- Schlegel, M.L., Manceau, A., Charlet, L., Chateigner, D., Hazemann, J.L., 2001b. Sorption of metal ions on clay minerals. III. Nucleation and epitaxial growth of Zn phyllosilicate on the edges of hectorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 4155–4170.
- Singh, B., Gilkes, R.J., 1996. Nature and properties of iron rich glaucoites and mottles from some south-west Australian soils. *Geoderma* 71, 95–120.
- Smith, R.M., Martell, A.E., 1976. *Critical Stability Constants, vol. 4. Inorganic Complexes*. Plenum Press, New York and London.
- Smith, R.M., Martell, A.E., 1989. *Critical Stability Constants, vol. 3. Other Organic Ligands*. Plenum Press, New York.
- Soulier, A., Regeard, A., Trolard, F., 1994. Calibration of selective extraction technique by citrate–bicarbonate on the basis of experimental dissolution of synthetic iron oxides.

- Proc. 15th World Cong. Soil Sci.*, 3b-II. Mexican Society of Soil Science, Acapulco, Mexico, pp.216–217.
- Spadini, L., Manceau, A., Schindler, P.W., Charlet, L., 1994. Structure and stability of Cd^{2+} surface complexes on ferric oxides. *J. Colloid Interf. Sci.* 168, 73–86.
- Steele, M.C., Pichtel, J., 1998. Ex-situ remediation of a metal-contaminated Superfund soil using selective extractants. *J. Environ. Eng. ASCE* 124, 639–645.
- Straub, K.L., Schink, B., 2004. Ferrihydrite reduction by *Geobacter* species is stimulated by secondary bacteria. *Arch. Microbiol.* 182, 175–181.
- Strawn, D.G., Sparks, D.L., 2000. Effects of soil organic matter on the kinetics and mechanisms of Pb(II) sorption and desorption in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 144–156.
- Strawn, D., Doner, H., Zavarin, M., McHugo, S., 2002. Microscale investigation into the geochemistry of arsenic, selenium and iron in soil developed in pyritic shale materials. *Geoderma* 108, 237–257.
- Sun, B., Zhao, F.J., Lombi, E., McGrath, S.P., 2001. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environ. Pollut.* 113, 111–120.
- Sutton, S.R., Rivers, M.L., Chien, S.H., 1999. Hard X-ray synchrotron microprobe techniques and applications. In: Schulze, D., Bertsch, P., Stucki, J. (Eds.), *Synchrotron X-ray Methods in Clay Science*. The Clay Minerals Society of America, pp. 146–163.
- Sutton, S.R., Bertsch, P.M., Newville, M., Rivers, M., Lanzirotti, A., Eng, P., 2002. Microfluorescence and microtomography analyses of heterogeneous earth and environmental materials. In: Fenter, P.A., Rivers, M.L., Sturchio, N.C., Sutton, S.R. (Eds.), *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science*, vol. 49. Mineralogical Society of America, pp. 429–478.
- Tandy, S., Bossart, K., Mueller, R., Ritschel, J., Hauser, L., Schulin, R., Nowack, B., 2004. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 38, 937–944.
- Teo, B.K., 1986. *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844–851.
- Thayalakumaran, T., Robinson, B.H., Vogeler, I., Scotter, D.R., Clothier, B.E., Percival, H.J., 2003a. Plant uptake and leaching of copper during EDTA-enhanced phytoremediation of repacked and undisturbed soil. *Plant Soil* 254, 415–423.
- Thayalakumaran, T., Vogeler, I., Scotter, D.R., Percival, H.J., Robinson, B.H., Clothier, B.E., 2003b. Leaching of copper from contaminated soil following the application of EDTA. I. Repacked soil experiments and a model. *Aust. J. Soil Res.* 41, 323–333.

- Thayalakumaran, T., Vogeler, I., Scotter, D.R., Percival, H.J., Robinson, B.H., Clothier, B.E., 2003c. Leaching of copper from contaminated soil following the application of EDTA. II. Intact core experiments and model testing. *Aust. J. Soil Res.* 41, 335–350.
- Thiry, M., Van Oort, F., 1999. Les phases minérales majeures et mineures d'une friche industrielle de métallurgie des métaux non-ferreux : Etat d'altération, évolution géochimique et devenir des métaux polluants du site de Mortagne-du-Nord. In: *Spéciation des métaux dans le sol*. Ecrin Editions, Paris, pp. 108–135.
- Thiry, M., Huet Taillanter, S., Schmitt, J.M., 2002. The industrial waste land of Mortagne-du-Nord (59)–I–Assessment, composition of the slags, hydrochemistry, hydrology and estimate of the outfluxes. *Bull. Soc. Geol. Fr.* 173, 369–381.
- Tichy, R., Rulkens, W.H., Grotenhuis, J.T.C., Nydl, V., Cuypers, C., Fajtl, J., 1998. Bioleaching of metals from soils or sediments. *Water Sci. Technol.* 37, 119–127.
- Trivedi, P., Dyer, J.A., Sparks, D.L., Pandya, K., 2004. Mechanistic and thermodynamic interpretations of zinc sorption onto ferrihydrite. *J. Colloid Interf. Sci.* 270, 77–85.
- Trolard, F., Bourrie, G., Jeanroy, E., Herbillon, A.J., Martin, H., 1995. Trace metals in natural iron oxides from laterites: A study using selective kinetic extraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1285–1297.
- Van Benschoten, J.E., Matsumoto, M.R., Young, W.H., 1997. Evaluation and analysis of soil washing for seven lead-contaminated soils. *J. Environ. Eng. ASCE* 123, 217–224.
- Vandevivere, P., Hammes, F., Verstraete, W., Feijtel, T., Schowanek, D., 2001a. Metal decontamination of soil, sediment, and sewage sludge by means of transition metal chelant [S,S]-EDDS. *J. Environ. Eng. ASCE* 127, 802–811.
- Vandevivere, P.C., Saveyn, H., Verstraete, W., Feijtel, T.C.J., Schowanek, D.R., 2001b. Biodegradation of metal–[S,S]-EDDS complexes. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1765–1770.
- Vassil, A.D., Kapulnik, Y., Raskin, I., Salt, D.E., 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol.* 117, 447–453.
- Voegelin, A., Pfister, S., Scheinost, A.C., Marcus, M.A., Kretzschmar, R., 2005. Changes in zinc speciation in field soil after contamination with zinc oxide. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6616–6623.
- Wasay, S.A., Barrington, S.F., Tokunaga, S., 1998. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *Environ. Technol.* 19, 369–379.
- Wasserman, S.R., 1997. The analysis of mixtures: Application of principal component analysis to XAS spectra. *J. Phys. IV* 7, 203–205.
- Wasserman, S.R., Allen, P.G., Shuh, D.K., Bucher, J.J., Edelstein, N.M., 1999. EXAFS and principal component analysis: a new shell game. *J. Synchrotron Rad.* 6, 284–286.

- Waychunas, G.A., Fuller, C.C., Davis, J.A., 2002. Surface complexation and precipitate geometry for aqueous Zn(II) sorption on ferrihydrite I: X-ray absorption extended fine structure spectroscopy analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2649–2662.
- Whitburn, J.S., Wilkinson, S.D., Williams, D.R., 1999. Chemical speciation of ethylenediamine–N,N'-disuccinic acid (EDDS) and its metal complexes in solution. *Chem. Spec. Bioavailab.* 11, 85–93.
- Wolery, T., 1992. EQ3/6. *A Software Package for Geochemical Modelling of Aqueous Systems: Package Overview and Installation Guide (Version 7.0). Technical Report UCRL-MA-110662 PT.* Lawrence Livermore National Laboratory, USA.
- Wu, J., Hsu, F.C., Cunningham, S.D., 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1898–1904.

CHAPITRE IV. Bilan de la phytoremédiation

Ce chapitre établit le bilan de la phytoremédiation sur le site pilote pour la période de seize mois, de mai 2002 à septembre 2003, entre les moments de la mise en dépôt du sol initial dans les casiers et du prélèvement des sols et des plantes à la fin de l'expérience de phytoremédiation dans le cadre de ce travail. Durant cette période les plantes ont accompli un cycle végétal annuel complet plus un été. Le bilan est établi ici à l'échelle macroscopique, en termes de concentrations totales. L'effet du traitement sur le sol est évalué pour chacune des variantes de traitement à partir des concentrations des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation. La balance de masse entre l'état initial et l'état final est établie pour quantifier la répartition des métaux entre le sol, les plantes et les lixiviats. La quantité extraite de métaux du sol suite au traitement est déterminée par la différence entre le stock initial et le stock résiduel dans le sol. La quantité accumulée dans la biomasse des plantes est déterminée comme le produit de la concentration d'un métal dans la plante (racines plus parties aériennes) par la biomasse totale par compartiment végétalisé à la fin de la phytoremédiation. La quantité lixiviée est estimée par la différence entre la quantité extraite du sol et la quantité accumulée dans la biomasse des plantes.

IV.1. Effet du traitement sur le sol

IV.1.1. Effet global au niveau du compartiment végétalisé

Une première approche d'évaluation de l'effet du traitement par phytoremédiation sur le sol est réalisée par comparaison des concentrations des éléments dans le sol des casiers avant et après phytoremédiation, dans le but de dégager les grandes tendances de cet effet.

Le sol prélevé sur le site contaminé a été homogénéisé avant sa mise en dépôt dans les quatre casiers du site pilote. Les résultats des analyses élémentaires effectuées individuellement sur chacun des quatre échantillons, prélevés dans les quatre casiers après la mise en dépôt et avant la plantation du sol, sont résumés dans le tableau IV.1. Les moyennes des concentrations des éléments traces analysés, calculées pour les quatre casiers du site pilote, sont de 2171 mg/kg (Zn), 607 mg/kg (Pb) et 380 mg/kg (Cu). Les écart-types de mesures sont de ± 60.67 mg/kg (Zn), ± 14.14 mg/kg (Pb) et ± 7.54 mg/kg (Cu). La variabilité de la mesure, exprimée sous forme du coefficient de variation (CV), est comprise entre 2.0 et 2.8 % pour les éléments traces analysés, et entre 1.2 et 2.5 % pour les éléments majeurs analysés (Tableau IV.1). Ces résultats montrent que les variations des concentrations entre les quatre échantillons prélevés dans les quatre casiers du site pilote avant phytoremédiation sont relativement faibles et assimilables à des incertitudes liées à l'analyse chimique, estimées au laboratoire à partir de plusieurs analyses du même échantillon (Tableau IV.1). La variabilité des concentrations entre les sols de quatre casiers est faible, et due vraisemblablement à la variabilité analytique plutôt qu'à la variabilité liée à l'hétérogénéité du sol. A partir de ces résultats, et du fait que le sol a été homogénéisé, le sol des casiers à l'état initial avant phytoremédiation peut être considéré comme homogène. Les concentrations moyennes calculées pour les quatre casiers sont considérées comme les concentrations initiales dans le sol avant phytoremédiation.

La comparaison des concentrations des métaux dans le sol initial avant phytoremédiation (Tableau IV.1) avec des concentrations dans les sols au bout de quatorze (Tableau IV.2) et seize mois de traitement (Tableau IV.3) montre que la phytoremédiation avec les trois plantes et dans les trois casiers a entraîné un abaissement plus ou moins important des concentrations totales des métaux dans le sol par rapport à l'état initial.

Les teneurs en métaux mesurées dans les sols en juin 2003, au bout de quatorze mois de traitement (Tableau IV.2), montrent que l'abaissement par rapport à l'état initial a eu lieu tant au niveau du sol non-rhizosphérique extrême (en bordure et en surface des compartiments) qu'au niveau du sol rhizosphérique (adhérent aux racines). Ces observations

suggèrent que l'ensemble du sol dans un compartiment végétalisé est influencé par le traitement.

Tableau IV.1. Concentrations des éléments dans le sol des casiers à l'état initial en mai 2002, avant phytoremédiation (C_i).

C_i (avant phytoremédiation)			
	Moy	ET	CV (%)
(mg/kg)			
Zn	2171	60.67	2.8
Pb	607	14.14	2.3
Cu	380	7.54	2.0
(wt. %)			
SiO ₂	76.6	0.95	1.2
CaO	6.5	0.08	2.1
Al ₂ O ₃	3.8	0.04	1.5
Fe ₂ O ₃	2.6	0.09	1.4
P ₂ O ₅	0.8	0.02	2.5
C org.	3.0	0.05	1.7

Moy : Moyenne calculée sur les quatre échantillons de sol prélevés chacun dans les quatre casiers du site pilote après l'homogénéisation, la mise en dépôt et avant la plantation du sol (cf. Chapitre II). ET : Ecart-type. CV : Coefficient de variation (%). L'incertitude sur le dosage est estimée à <1% (SiO₂), <2% (CaO, C org.), <3% (Al₂O₃), <5% (Zn, Cu, Fe₂O₃, P₂O₅), <8% (Pb).

Cependant, on constate des variations des concentrations entre les compartiments végétalisés, et entre les deux points de prélèvement (sol non-rhizosphérique extrême et sol rhizosphérique) au sein de chacun des compartiments. Compte tenu du fait que l'expérience de la phytoremédiation avec différentes espèces végétales suivant diverses modalités a été menée sur le même sol, homogénéisé et pouvant être considéré comme initialement homogène, les différences des concentrations observées suite au traitement sont introduites par les facteurs liés au traitement, et résultant de l'interaction entre le sol, l'espèce végétale et les traitements physico-chimiques (irrigation, ajout du citrate). Les variations des concentrations sont dues à « l'effet du traitement » sur le sol, mais aussi à la variabilité de la mesure liée à l'hétérogénéité du sol induite par le traitement, au prélèvement, à la préparation et à l'analyse d'échantillons.

Tableau IV.2. Concentrations des éléments dans les sols des casiers en juin 2003.

Sols non-rhizosphériques extrêmes ^{a,c}															
(mg/kg)	Casier Témoin					Casier Redox					Casier Citrate				
	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)
Zn	1100	1300	1200	1200	8	1000	1100	1100	1067	5	1000	900	1100	1000	10
Pb	460	473	415	449	7	455	477	451	461	3	458	421	457	445	5
Cu	320	516	338	391	28	303	330	342	325	6	256	239	269	255	6

Sols rhizosphériques (adhérents aux racines) ^{b,c}															
(mg/kg)	Casier Témoin					Casier Redox					Casier Citrate				
	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)
Zn	1200	1100	-	1150	6	1000	1100	-	1050	7	1000	1000	-	1000	0
Pb	439	453	-	446	2	425	484	-	455	9	457	428	-	443	5
Cu	332	330	-	331	0	289	318	-	304	7	254	291	-	273	10

^a Sols prélevés en dehors du système racinaire, en bordure et en surface (~0-10 cm) du compartiment végétalisé (cf. Chapitre II).

^b Sols prélevés au niveau du système racinaire, sous forme de particules de sol adhérent aux racines (cf. Chapitre II). Les sols de *Salix viminalis* n'ont pas été échantillonnés lors de cette campagne.

^c L'incertitude sur le dosage est estimée à <5% (Zn, Cu) et <8% (Pb).

La variabilité des paramètres du sol nécessite, dans l'idéal, un nombre important d'échantillons pour estimer la variabilité de la mesure afin que les différences dues à « l'effet du traitement » soient quantifiables sur les bases statistiques solides. Dans notre cas, vu les principaux objectifs de l'étude, le nombre important de variantes de traitement, et la lourdeur des analyses, cet objectif s'est avéré trop ambitieux. De fait, l'échantillonnage du sol a été limité à deux types de sol représentant l'ensemble du sol d'un compartiment, prélevés sans réplication (cf. Partie II.3.3, Chapitre II). Etant donné le faible nombre d'échantillons, les tests statistiques *ad hoc* n'ont pas été réalisés. Toutefois, en examinant les moyennes et les coefficients de variation (CV) par casier et par type de sol en juin 2003, on peut estimer grossièrement que les variations des concentrations des métaux entre les sols des compartiments par casier se situent entre 0 et 10 % (Tableau IV.2). Le CV exceptionnellement élevé pour Cu dans le sol non-rhizosphérique extrême du casier témoin (28 %) est dû à la valeur aberrante de 516 mg/kg de Cu dans le compartiment à phragmite. Cette valeur semble être un artéfact de mesure, car elle est de 36 % supérieure par rapport à la teneur en Cu dans le sol initial (380 mg/kg), et il semble invraisemblable qu'il y ait eu un

apport naturel de 36 % de Cu supplémentaire dans le casier. Au regard des incertitudes maximales sur le dosage, estimées à 5 % (Zn, Cu) et 8 % (Pb), les variations des concentrations entre les différents compartiments n'excédant pas 10 % peuvent être considérées comme peu significatives. Si l'on examine les teneurs dans les sols non-rhizosphériques extrêmes par rapport à celles dans les sols rhizosphériques adhérents aux racines mesurées en juin 2003, on constate que les différences entre ces deux types de sol par compartiment sont dans la plupart des cas relativement faibles (<10 %), positives ou négatives de manière aléatoire, avec des maximums de -15 % en Zn (compartiment témoin phragmite) et +22 % en Cu (compartiment citrate phragmite). Ces observations laissent supposer que la séparation du sol rhizosphérique, telle qu'elle a été effectuée, sous forme de particules adhérentes aux racines, après extraction et secouement de la plante (cf. Partie II.3.3, Chapitre II), n'a pas été rigoureuse, et que les échantillons du sol rhizosphérique ainsi obtenus pourraient contenir également du sol non-rhizosphérique.

Si l'on compare les concentrations dans les sols non-rhizosphériques extrêmes mesurées en juin 2003 (Tableau IV.2) et en septembre 2003 (Tableau IV.3), en éliminant la valeur aberrante pour Cu dans le compartiment témoin phragmite en juin 2003, on peut constater que les concentrations des métaux dans ce type de sol en septembre 2003 augmentent pour tous les compartiments. Les augmentations sont les suivantes : pour Zn, 5 et 6 % dans deux compartiments (citrate salix et témoin phragmite) et 19 à 37 % dans sept autres compartiments ; pour Pb, 20 et 27 % dans deux compartiments (citrate phragmite et témoin salix) et 0.2 à 9 % dans les autres compartiments ; pour Cu, 32 % dans un compartiment (citrate phragmite) et 2 à 13 % dans les autres compartiments. Il faut noter que ces deux séries d'échantillons ont été prélevées selon le même protocole en juin et en septembre, mais leurs analyses ont été effectuées dans deux laboratoires différents. En principe, les analyses dans les deux laboratoires ont été effectuées selon la même méthode (minéralisation, puis analyse par ICP), mais en pratique, des variations pourraient se présenter, comme c'est d'ailleurs souvent le cas, aux niveaux des équipements, des réactifs et des compétences des analystes. Compte tenu de ce fait, et du fait que ce sol non-rhizosphérique extrême est un sol prélevé en surface, l'augmentation des concentrations dans ce sol entre juin et septembre ne semble pas être due aux variations temporelles. En effet, il semble peu probable qu'en moins de trois mois il y ait eu un apport naturel de l'ordre de 20-30 % des métaux supplémentaires dans ce sol de surface. Il faut noter également que si les différences entre ces deux séries sont considérables (de l'ordre de 20-30 %), dans la majorité des cas pour Zn et dans certains cas pour Pb et Cu, les valeurs sont peu variables entre elles dans les deux séries (CV<10 %). Ces observations suggèrent que les variations entre les deux séries sont dues probablement à la variabilité analytique inter-laboratoires plutôt qu'à la variabilité liée au prélèvement. A partir de ces observations, si l'on part du

principe qu'il n'y a pas eu de modification réelle des teneurs en métaux dans le sol non-rhizosphérique extrême entre juin 2003 et septembre 2003, on pourrait considérer que le traitement pendant ces mois de l'été n'a pas apporté d'effet considérable en termes d'abaissement de concentrations, du moins au niveau de ce sol de surface. Toutefois, il faut noter pour l'information, que l'été 2003 en France a été un été exceptionnel de canicule, avec les températures > 30°C pendant les deux premières semaines d'août.

Tableau IV.3. Concentrations des éléments dans les sols des casiers à l'état final en septembre 2003, après phytoremédiation (C_f).

C _f (après phytoremédiation)															
Sols non-rhizosphériques extrêmes ^{a,c}															
	Casier Témoin					Casier Redox					Casier Citrate				
	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)
(mg/kg)															
Zn	1356	1379	1440	1392	3	1218	1407	1480	1368	10	1193	1235	1159	1196	3
Pb	488	498	527	504	4	481	496	492	490	2	481	506	458	482	5
Cu	349	363	379	363	4	310	354	382	349	10	290	316	279	295	6
Sols rhizosphériques + non-rhizosphériques moyens (blocs) ^{b,c}															
	Casier Témoin					Casier Redox					Casier Citrate				
	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)	Iris	Phrag.	Salix	Moy	CV (%)
(mg/kg)															
Zn	1372	534	1354	1087	44	1041	673	1352	1022	33	1068	383	847	766	46
Pb	468	177	463	370	45	408	241	439	363	29	432	147	423	334	49
Cu	349	133	354	278	45	272	177	346	265	32	267	93	198	186	47
(wt.%)															
SiO₂	73.1	54.8	73.8	67.2	16	69.5	60.7	72.2	67.5	9	74.3	52.3	76.6	67.7	20
CaO	4.7	8.1	4.5	5.8	35	4.6	7.7	4.9	5.7	30	3.9	6.2	2.9	4.3	40
Al₂O₃	3.5	3.4	3.4	3.4	1	3.7	3.5	3.5	3.6	3	3.4	3.8	3.4	3.5	6
Fe₂O₃	2.5	1.9	2.4	2.3	13	2.5	2.1	2.4	2.3	9	2.5	1.9	2.3	2.2	13
P₂O₅	0.8	0.4	0.8	0.7	37	0.6	0.4	0.8	0.6	33	0.7	0.3	0.5	0.5	36
C org.	3.9	10.1	3.7	5.9	62	5.3	7.1	3.8	5.4	31	3.9	11.9	3.5	6.4	74

^a Sols prélevés en dehors du système racinaire, en bordure et en surface (~0-10 cm) du compartiment végétalisé (cf. Chapitre II).

^b Sols prélevés au niveau du système racinaire, sous forme de blocs non-remaniés de 15 cm de hauteur, 10 cm de largeur et de 5 cm d'épaisseur, correspondant au profil à profondeur ~17-32 cm (cf. Chapitre II).

^c L'incertitude sur le dosage est estimée à <1% (SiO₂), <2% (CaO, C org.), <3% (Al₂O₃), <5% (Zn, Cu, Fe₂O₃, P₂O₅), <8% (Pb).

Les teneurs mesurées en juin 2003 dans les sols rhizosphériques adhérents aux racines (Tableau IV.2) et en septembre 2003 dans les sols des blocs non-remaniés (Tableau IV.3) sont très difficiles à comparer directement, car d'une part, les prélèvements de ces deux séries d'échantillons ont été effectués selon les protocoles différents, et d'autre part, leurs analyses ont été effectuées dans les laboratoires différents.

Au prélèvement final en septembre 2003, la couche de sol d'une profondeur initiale de 0-50 cm dans chacun des compartiments végétalisés est représentée par deux types de sol. Le sol des blocs non-remaniés (l'ensemble du sol rhizosphérique et du sol non-rhizosphérique moyen) de 15 cm de hauteur, 10 cm de largeur et de 5 cm d'épaisseur, qui est prélevé dans le profil colonisé par les racines, à profondeur ~17-32 cm, représente le sol au niveau du système racinaire. Le sol non-rhizosphérique extrême, qui est prélevé en surface (~0-10 cm) et en bordure d'un compartiment, représente le sol en dehors du système racinaire (cf. Partie II.3.3, Chapitre II). Compte tenu de la profondeur de prélèvement de ces deux types de sol, et du tassement général de la couche de sol observé après seize mois de traitement, on peut considérer que ces deux types de sol sont représentatifs du profil total de la couche de sol. De manière générale, les teneurs en métaux dans ces deux types de sol après phytoremédiation (Tableau IV.3) montrent un abaissement par rapport au sol initial (Tableau IV.1). La comparaison des teneurs en métaux entre les deux types de sol après phytoremédiation montre que les sols des blocs non-remaniés, prélevés en profondeur, au niveau du système racinaire, sont plus appauvris en métaux que les sols prélevés en surface, en dehors du système racinaire, pour la quasi-totalité des compartiments (Tableau IV.3). Cette tendance laisse supposer qu'il n'y a pas eu d'accumulation des métaux le long du profil. L'appauvrissement en métaux plus important dans le sol au niveau du système racinaire est dû, en toute vraisemblance, à l'influence racinaire résultant de l'ensemble des processus impliqués dans la mobilisation dans le sol et le prélèvement des éléments par les racines. L'ensemble des tendances observées suggère que pendant la phytoremédiation les métaux ont été remobilisés et extraits du sol par le prélèvement et l'accumulation dans les plantes et/ou par la lixiviation.

A partir des concentrations des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation, l'efficacité du traitement (ET) peut être exprimée en taux d'extraction des métaux du sol, soit le pourcentage massique des métaux extraits par kilogramme de sol, pour chaque variante de traitement selon la formule suivante :

$$ET (\%) = [(C_i - C_f)/C_i] \times 100, \quad (3)$$

où C_i et C_f représentent les concentrations des métaux (en mg/kg) dans le sol à l'état initial avant phytoremédiation et dans le sol à l'état final après phytoremédiation, respectivement.

Pour pouvoir estimer l'efficacité globale du traitement au niveau du compartiment végétalisé, il est nécessaire de considérer l'ensemble du sol dans le compartiment. Afin de tenir compte du gradient spatial de l'influence racinaire dans un compartiment, les taux d'extraction ont été calculés séparément pour le sol en dehors du système racinaire (sol non-rhizosphérique extrême) et pour le sol au niveau du système racinaire (sol rhizosphérique + non-rhizosphérique moyen). L'efficacité globale au niveau d'un compartiment végétalisé peut alors être considérée dans une fourchette des valeurs entre le taux minimal obtenu dans le sol en éloignement extrême par rapport aux racines et le taux maximal obtenu dans le sol de blocs au niveau du système racinaire (Tableau IV.4).

Tableau IV.4. Efficacité du traitement (ET) exprimée en taux d'extraction des métaux du sol.

Sols non-rhizosphériques extrêmes ^a												
	Casier Témoin				Casier Redox				Casier Citrate			
	Iris	Phrag.	Salix	Moy	Iris	Phrag.	Salix	Moy	Iris	Phrag.	Salix	Moy
Zn	38 %	36 %	34 %	36 %	44 %	35 %	32 %	37 %	45 %	43 %	47 %	45 %
Pb	20 %	18 %	13 %	17 %	21 %	18 %	19 %	19 %	21 %	17 %	25 %	21 %
Cu	8 %	5 %	0 %	4 %	18 %	7 %	-1 %	8 %	24 %	17 %	27 %	22 %
Sols rhizosphériques + non-rhizosphériques moyens (blocs) ^b												
	Casier Témoin				Casier Redox				Casier Citrate			
	Iris	Phrag.	Salix	Moy	Iris	Phrag.	Salix	Moy	Iris	Phrag.	Salix	Moy
Zn	37 %	75 %	38 %	50 %	52 %	69 %	38 %	53 %	51 %	82 %	61 %	65 %
Pb	23 %	71 %	24 %	39 %	33 %	60 %	28 %	40 %	29 %	76 %	30 %	45 %
Cu	8 %	65 %	7 %	27 %	28 %	53 %	9 %	30 %	30 %	76 %	48 %	51 %

^a Sols prélevés en dehors du système racinaire, en bordure et en surface (~0-10 cm) du compartiment végétalisé (cf. Chapitre II).

^b Sols prélevés au niveau du système racinaire, sous forme de blocs non-remaniés de 15 cm de hauteur, 10 cm de largeur et de 5 cm d'épaisseur, correspondant au profil à profondeur ~17-32 cm (cf. Chapitre II).

En moyenne pour les trois compartiments de chaque casier, les taux d'extraction se situent dans les fourchettes : 36-50 % (Zn), 17-39 % (Pb), 4-27 % (Cu) dans le casier témoin ; 37-53 % (Zn), 19-40 % (Pb), 8-30 % (Cu) dans le casier redox ; 45-65 % (Zn), 21-45 % (Pb), 22-51 % (Cu) dans le casier citrate. Pour les trois casiers, l'efficacité globale la plus élevée est systématiquement obtenue dans les compartiments à phragmite. Les fourchettes d'extraction dans ces compartiments représentent : 36-75 % (Zn), 18-71 % (Pb), 5-65 % (Cu) dans le casier témoin ; 35-69 % (Zn), 18-60 % (Pb), 7-53 % (Cu) dans le casier redox ; et 43-82 % (Zn), 17-76 % (Pb), 17-76 % (Cu) dans le casier citrate. Rappelons qu'outre l'action des plantes, les trois casiers ont été soumis au traitement par l'irrigation artificielle à l'eau avec l'alternance des périodes d'arrosages abondants et des périodes sans ou avec peu d'arrosages. Le casier témoin a reçu des arrosages abondants de 1600 L en un jour, avec une fréquence bimensuelle. Le casier redox a été arrosé avec 1600 L en un jour, avec une fréquence hebdomadaire. Le casier citrate a été soumis au même régime d'irrigation que le casier témoin, mais aussi à une période de traitement chimique au citrate (cf. Chapitre II). Puisque nous ne disposons pas d'un casier soumis à l'irrigation sans plantes, qui aurait pu témoigner de l'effet de l'irrigation, l'effet de l'irrigation et l'effet des plantes ne peuvent pas être rigoureusement dissociés. L'abaissement des teneurs dans le sol résulte de l'effet combiné des plantes et de l'irrigation dans le casier témoin et dans le casier redox, et de l'effet combiné des plantes, de l'irrigation et du citrate dans le casier citrate.

Les fourchettes des taux d'extraction obtenus dans le casier témoin et le casier redox, en moyenne pour les trois compartiments de chaque casier, sont similaires. Les différences observées par type de sol entre ces deux casiers ne dépassent pas ≤ 3 % pour Zn, ≤ 2 % pour Pb et ≤ 4 % pour Cu. Au regard de l'incertitude de la mesure liée au dosage (< 5 % pour Zn et Cu, < 8 % pour Pb), ces différences ne sont pas significatives. Ces observations suggèrent que l'irrigation plus fréquente, et plus importante en termes d'apport total en eau, pratiquée dans le casier redox, par rapport au casier témoin, ne produit pas d'effet considérable en termes d'abaissement des teneurs en métaux. Par rapport à ces deux casiers, les différences en taux d'extraction observées dans le casier citrate, en moyenne pour les trois compartiments, sont plus importantes. Ces différences, pour les fourchettes, sont plus prononcées pour Cu ($\leq 18-24$ %) et pour Zn ($\leq 10-15$ %) que pour Pb ($\leq 2-6$ %). L'absence de répétitions des différentes modalités de traitement ne permet pas en toute rigueur de statuer sur le caractère significatif de ces différences, mais la tendance montre que l'ajout du citrate apporte un effet supplémentaire à l'effet combiné des plantes et de l'irrigation, qui augmente l'efficacité du traitement plus particulièrement pour Cu et Zn. Pour une question de temps, les trois casiers n'ont pas pu être étudiés en détails dans le

cadre de ce travail. Nous avons donc choisi de focaliser la suite de l'étude plus particulièrement sur deux casiers : casier témoin et casier citrate.

IV.1.2. Effet sur le sol au niveau du système racinaire

Les fourchettes entre les taux d'extraction obtenus dans le sol en dehors du système racinaire (valeur minimale) et dans le sol au niveau du système racinaire (valeur maximale) dans un compartiment végétalisé caractérisent le gradient d'influence racinaire en conjonction avec le traitement physico-chimique, dans un volume de sol donné, pour une période de la croissance végétale donnée, et pour une densité de plantation donnée. Ces paramètres du système sont à prendre en compte pour une estimation de l'efficacité. La densité de plantation, par exemple, est un paramètre essentiel, car elle conditionne directement le volume du système racinaire dans un compartiment végétalisé. Il faut noter que la densité de plantation pratiquée sur le site pilote dans notre cas (2 plantes/m²) est faible par rapport à la densité de plantation habituellement pratiquée dans des procédés type « filtres plantés de macrophytes » (8 plantes/m²) (Hammer, 1989). Une densité de plantation plus importante permettrait d'augmenter le volume du système racinaire dans un compartiment, et d'améliorer l'efficacité globale au niveau du compartiment végétalisé.

Le sol au niveau du système racinaire contient, pour une part, le sol rhizosphérique, qui est en contact direct avec les racines et dans lequel l'influence racinaire est maximale. De ce fait, les taux d'extraction dans le sol au niveau du système racinaire représentent le mieux l'effet de l'espèce végétale, et plus particulièrement l'effet de la rhizosphère. Etant donné que les systèmes sol-plantes d'un même casier ont été soumis au même traitement physico-chimique (irrigation dans le casier témoin, irrigation plus citrate dans le casier citrate), les différences en taux d'extraction observées entre les sols des différentes plantes du même casier pourraient être caractéristiques de l'effet de l'espèce végétale.

Pour chacune des espèces végétales dans le casier témoin, les taux d'extraction obtenus dans le sol au niveau du système racinaire se situent dans l'ordre suivant : Zn > Pb > Cu. En moyenne pour les trois espèces végétales, ces taux sont de 50 % (Zn), 39 % (Pb) et 27 % (Cu) (Tableau IV.4). Ces observations suggèrent que la mobilité et la biodisponibilité des métaux dans le système sol-plante représente en ordre décroissant : Zn > Pb > Cu. Notons que dans le sol initial avant phytoremédiation, le zinc a été associé majoritairement à des minéraux secondaires (oxyhydroxyde de fer, phosphate, et phyllosilicate) et le cuivre a été associé essentiellement à la matière organique (cf. Chapitre III, Chapitre VI). La plus forte extraction du zinc par rapport au cuivre suggère

a priori que dans ce type de sol les phases porteuses minérales seraient plus facilement altérées que la matière organique.

En tenant compte des tendances, l'effet de l'espèce végétale est globalement le suivant : phragmite > saule \approx iris. Les taux d'extraction dans les sols de l'iris et du saule sont quasiment identiques et représentent 37-38 % (Zn), 23-24 % (Pb) et 7-8 % (Cu). En comparaison avec ces deux espèces, les taux d'extraction dans le sol du phragmite sont sensiblement supérieurs pour Zn (75 %) et Pb (71 %), et plus particulièrement pour Cu (65 %). Au regard de l'incertitude liée au dosage (<5 % pour Zn et Cu, <8 % pour Pb), les différences entre les taux d'extraction dans le sol du phragmite et ceux de deux autres plantes dans le casier témoin (37 % pour Zn, 47 % pour Pb, et 57 % pour Cu) sont significatives. Le nombre limité de prélèvements par compartiment ne permet pas de mettre en évidence le caractère significatif de ces différences au regard de la variabilité de mesure liée au prélèvement. Néanmoins, on peut constater que les mêmes tendances entre les espèces végétales, et les différences similaires sont observées également dans le casier redox et le casier citrate, l'extraction dans ces deux casiers dans le sol du phragmite étant de 17-31 % (Zn), 27-47 % (Pb) et 25-46 % (Cu) supérieure par rapport aux sols de deux autres plantes (Tableau IV.4). Ces observations suggèrent que l'extraction supérieure obtenue dans le sol du phragmite ne peut être due que partiellement à la variabilité de la mesure. L'effet supérieur du phragmite sur le sol pourrait expliquer ces différences.

En effet, le sol au niveau du système racinaire (sol rhizosphérique + sol non-rhizosphérique moyen) du phragmite dans le casier témoin est 2.5 (Zn) à 2.6 fois (Pb et Cu) plus appauvri que les sols de l'iris et du saule (Tableau IV.3). L'appauvrissement plus important du sol du phragmite en métaux suggère une plus forte réactivité de la rhizosphère du phragmite par rapport à celles de l'iris et du saule. Parallèlement à l'appauvrissement en métaux, le sol du phragmite est 2.5 fois plus riche en carbone organique que les sols de l'iris et du saule (Tableau IV.3) et 3.4 fois plus riche que le sol initial (Tableau IV.1). Cet enrichissement indique une plus forte concentration des composés organiques exsudés dans la rhizosphère du phragmite (rhizodéposition carbonée), et par conséquent, une plus forte activité biotique, puisque le carbone produit est la source majeure d'énergie pour les microorganismes (Hinsinger, 1998b). Il est possible que les plantes n'exsudent pas tout à fait les mêmes composés organiques, et n'abritent pas les mêmes microorganismes. En particulier, le phragmite, qui est une espèce graminée, peut exsuder des phytosidérophores (acides aminés) qui possèdent des capacités de complexation de Fe, Zn et Cu bien supérieures à celles d'autres exsudats racinaires tels que les acides carboxyliques ou phénoliques (Treeby et al., 1989; Marschner and Römheld, 1994; Hinsinger, 1998a). La rhizosphère apparemment plus active du phragmite permettrait de remobiliser plus efficacement les phases porteuses de trois métaux, et en particulier d'altérer la matière

organique porteuse de Cu, par compétition avec des composés organiques exsudés dans la rhizosphère.

Comme nous l'avons vu précédemment, en tenant compte des tendances, l'ajout du citrate apporte un effet supplémentaire. Dans le sol au niveau du système racinaire du casier citrate, pour les trois plantes, les taux d'extraction obtenus apparaissent supérieurs par rapport au casier témoin. En moyenne pour les sols de trois plantes, ces taux augmentent de 15 % pour Zn, 6 % pour Pb et 24 % pour Cu (Tableau IV.4). L'augmentation la plus élevée est observée pour le saule vis-à-vis de Cu (+41 %) et vis-à-vis de Zn (+23 %), suivie de l'iris vis-à-vis de Cu (+22 %) et vis-à-vis de Zn (+14 %), suivie du phragmite vis-à-vis de Cu (+11 %) et vis-à-vis de Zn (+7 %). L'augmentation de l'extraction de Pb est comparable pour les sols de trois plantes (+6 %). Ces observations suggèrent que l'application du citrate au système sol-plante favorise la remobilisation et l'extraction des métaux dans l'ordre décroissant : Cu > Zn > Pb. Cette tendance, observée sur le site pilote (système sol-plante-citrate), est en accord avec la tendance observée lors des essais au laboratoire, lorsque le citrate a été appliqué au sol en absence des plantes (système sol-citrate). L'ensemble de ces observations suggère que sur le site pilote le traitement au citrate produit sur le sol un effet supplémentaire à l'effet des plantes et de l'irrigation. L'effet du citrate sur le sol semble être qualitativement le même en absence comme en présence des plantes, et il se traduit par la remobilisation des métaux suivant leurs affinités pour le citrate. La remobilisation dans l'ordre Cu > Zn > Pb sous l'action du citrate correspond globalement à l'ordre de stabilité des complexes métal-citrate, les complexes Cu-citrate étant les plus stables ($\log K = 5.90$), suivis des complexes Zn-citrate ($\log K = 4.98$) et Pb-citrate ($\log K = 4.08$) (cf. Chapitre III). Etant donné l'échantillonnage limité, l'absence de répétitions, l'absence du casier soumis à l'irrigation sans plantes sur le site pilote, l'effet du citrate ne peut pas être rigoureusement dissocié et quantifié. Il faut noter par ailleurs que le traitement au citrate lors de l'expérience de phytoremédiation a été effectué ponctuellement, durant un mois, environ cinq mois après le début et dix mois avant la fin de l'expérience de la phytoremédiation. De ce fait, les différences observées à la fin de la phytoremédiation entre les sols des différentes espèces végétales pourraient être dues à d'autres facteurs tels que, par exemple, la croissance et la propagation du système racinaire, ce qui expliquerait les différences entre les espèces végétales observées dans le temps.

En résumé de cette partie, une première approche d'évaluation de l'effet du traitement sur le sol, en termes de concentrations totales, montre que la phytoremédiation avec les trois plantes dans le dispositif des casiers a permis d'extraire une fraction importante des métaux du sol en seize mois. L'extraction des métaux du sol suggère leur remobilisation sous l'action combinée des plantes et des traitements physico-chimiques.

L'extraction la plus importante est obtenue dans le sol au niveau du système racinaire des plantes. Ceci est dû à l'effet de la plante résultant de l'influence racinaire, et plus particulièrement de l'effet de la rhizosphère. Les tendances montrent que l'iris et le saule obtiennent des taux d'extraction similaires, qui sont de 37-38 % pour Zn, 23-24 % pour Pb et 7-8 % pour Cu. Par rapport à ces deux plantes, le phragmite apparaît sensiblement plus efficace pour la remobilisation et l'extraction de Zn (75 %) et de Pb (71 %), et permet surtout de remobiliser et d'extraire une fraction importante de Cu (65 %). La phytoremédiation assistée par l'ajout du citrate favorise la remobilisation et l'extraction des métaux dans l'ordre décroissant : $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Pb}$, pour les trois plantes. Les tendances dégagées laissent supposer que la phytoremédiation dans ce dispositif des casiers pourrait impliquer deux mécanismes : le prélèvement et l'accumulation des métaux par les plantes et/ou la lixiviation des métaux du sol.

IV.2. Phytoaccumulation des métaux

La figure IV.1 présente les concentrations des métaux mesurées dans les parties aériennes et dans les racines des plantes du casier témoin et du casier citrate à la fin de la phytoremédiation. Rappelons que l'échantillonnage des plantes sur le site pilote a été limité à une plante par compartiment, sans réplicas (cf. Partie II.3.4, Chapitre II). Ceci ne permet pas en toute rigueur de statuer sur le caractère significatif des différences observées entre les espèces végétales, ce qui limite la portée des conclusions qui peuvent être tirées lors de leur comparaison. Néanmoins, il est possible à partir de ces données de dégager les tendances générales de l'accumulation des métaux chez ces plantes.

Les concentrations mesurées dans les tissus végétaux en absence du traitement au citrate (casier témoin) montrent que ces plantes accumulent naturellement de faibles teneurs en métaux (Figure IV.1, a,c). Ceci n'est pas surprenant puisque les plantes utilisées sont des plantes tolérantes et non hyperaccumulatrices. Les concentrations mesurées dans notre cas sont du même ordre de grandeur que les concentrations généralement observées pour ces types de plantes (Ye et al., 1998; McCabe et al., 2001; Ye et al., 2003). D'après les tendances, parmi les trois éléments mesurés dans les tissus végétaux, l'élément le plus accumulé est le zinc. Parmi les trois plantes, c'est le saule qui accumule le plus de zinc. Les teneurs en plomb et en cuivre dans les tissus de trois plantes sont comparables et sensiblement inférieures à celles en zinc, les teneurs apparemment plus élevées étant observées dans les racines par rapport aux parties aériennes. Le cuivre est un élément très phytotoxique pour la plupart des végétaux supérieurs, avec un seuil de la phytotoxicité de ~30 mg/kg dans les parties aériennes (Marschner, 1995). Dans notre cas, les teneurs en

cuivre dans les parties aériennes des plantes sont faibles, et ne dépassent pas le seuil de la phytotoxicité du cuivre. En même temps, les teneurs dans les parties aériennes sont globalement inférieures à celles dans les racines. Ces observations suggèrent que ces plantes adoptent des mécanismes physiologiques de résistance vis-à-vis du cuivre au niveau des racines.

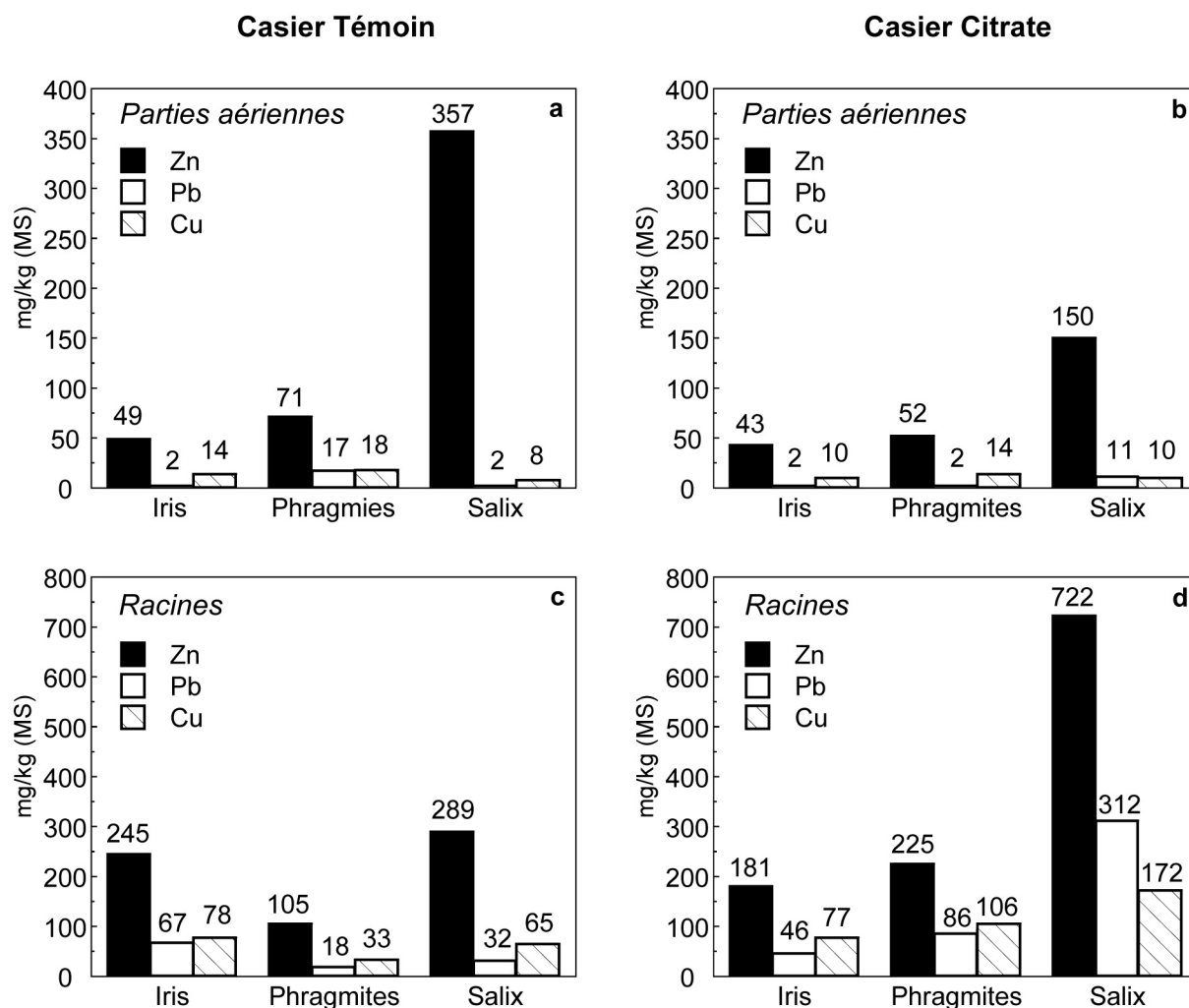


Figure IV.1. Concentrations des métaux dans les parties aériennes (a, b) et dans les racines (c, d) des plantes dans le casier témoin et dans le casier citrate. L'incertitude sur le dosage est estimée à <10% (Zn), <15% (Pb, Cu).

En tenant compte des tendances, en présence du citrate (casier citrate), les teneurs en métaux dans les racines des plantes augmentent dans la majorité des cas (Figure IV.1, d). Ceci suggère que l'apport du citrate augmente la solubilité des métaux dans le sol et favorise leur transfert vers les racines. Or, il apparaît que l'apport du citrate n'induit pas, et diminue même, le transfert et l'accumulation des métaux dans les parties aériennes des plantes, comme le montre la diminution générale des teneurs en métaux dans les parties

aériennes des plantes en présence du citrate par rapport au témoin (Figure IV.1, b). Les teneurs en métaux dans les parties aériennes sont de 4 à 43 fois moins élevées que celles dans les racines, suivant le métal et la plante. Ce phénomène est illustré par la diminution des coefficients de translocation des métaux, soit des rapports entre les concentrations mesurées dans les parties aériennes et dans les racines ($C_{p.a.}/C_{racines}$) (Tableau IV.5).

Tableau IV.5. Coefficients de translocation ($C_{p.a.}/C_{racines}$) des métaux dans les plantes.

	Casier Témoin			Casier Citrate		
	Iris	Phragmites	Salix	Iris	Phragmites	Salix
Zn	0.20	0.68	1.24	0.24	0.23	0.21
Pb	0.03	0.94	0.06	0.04	0.02	0.04
Cu	0.18	0.55	0.12	0.13	0.13	0.06

A l'exception de l'iris, la translocation racines - parties aériennes diminue sensiblement dans le casier citrate. Bien que les plantes de ce casier soient exposées aux concentrations plus élevées des métaux solubles et donc potentiellement biodisponibles, aucun symptôme de toxicité apparent sur la production de la biomasse, sur la croissance et sur la physiologie des plantes n'a été observé. Ces tendances laissent supposer qu'en présence de l'excès des métaux solubles les plantes adoptent des mécanismes de détoxification, qui leur permettent de tolérer la présence des métaux toxiques dans le sol et de réguler l'accumulation des métaux dans les tissus en limitant leur transfert vers les parties aériennes.

La biomasse totale des plantes par compartiment des casiers a été déterminée comme le produit de la biomasse sèche mesurée à partir d'une plante (racines plus parties aériennes) par le nombre de plantes dans le compartiment (10 plantes par compartiment soit 2 plantes/m²). Ainsi, sur le site pilote, le saule produit 10 kg de la biomasse par compartiment soit 1887 g/m², l'iris 9 kg par compartiment soit 1698 g/m², et le phragmite 7 kg par compartiment soit 1321 g/m².

La masse des métaux accumulés dans les plantes a été déterminée par compartiment comme le produit de la concentration dans les plantes (racines et parties aériennes) par la biomasse totale des plantes dans le compartiment. Les valeurs obtenues se situent dans l'intervalle entre la valeur minimale obtenue pour le phragmite dans le casier

témoin et la valeur maximale obtenue pour le saule dans le casier citrate : 1.3.-8.7 g de Zn, 0.3-3.2 g de Pb et 0.4-1.8 g de Cu. Les stocks totaux des métaux dans le sol initial par compartiment ont été calculés à partir des concentrations des métaux dans le sol (Tableau IV.1) et de la masse du sol sec par compartiment, qui est estimée à 1881 kg (cf. Partie II.2.2., Chapitre II). Les stocks des métaux dans le sol initial par compartiment s'élèvent à 4084 g de Zn, 1142 g de Pb et de 715 g de Cu. Il apparaît alors que par rapport au stock initial des métaux dans le sol, la masse des métaux accumulés dans les plantes est d'environ trois ordres de grandeur inférieure. Ceci est illustré par le calcul des fractions des métaux extraits du sol par accumulation dans la biomasse des plantes (F_p), soit des pourcentages de la masse des métaux accumulés dans les plantes par rapport à la masse des métaux dans le sol initial (Tableau IV.6) selon la formule suivante :

$$F_p (\%) = M_p/M_i = Q_p C_p / Q_i C_i \times 100, \quad (4)$$

où M_p et M_i représentent la masse du métal dans les plantes (racines plus parties aériennes) et la masse du métal dans le sol initial, respectivement, C_p et C_i sont les concentrations (mg/kg) du métal dans la plante (racines plus parties aériennes) et dans le sol initial respectivement, Q_p est la biomasse par compartiment (kg MS) et Q_i est la masse du sol sec par compartiment (1881 kg MS).

Tableau IV.6. Pourcentages des métaux accumulés dans la biomasse des plantes (racines plus parties aériennes) par rapport au stock initial dans le sol.

	Casier Témoin			Casier Citrate		
	Iris	Phragmites	Salix	Iris	Phragmites	Salix
Zn	0.06 %	0.03 %	0.16 %	0.05 %	0.05 %	0.21 %
Pb	0.05 %	0.02 %	0.03 %	0.04 %	0.06 %	0.28 %
Cu	0.12 %	0.05 %	0.10 %	0.11 %	0.12 %	0.25 %

Les résultats obtenus montrent que, malgré la production de biomasses importantes, en absence comme en présence du citrate, ces plantes de milieux humides n'accumulent dans leurs tissus qu'une faible fraction des métaux. Cette fraction apparaît non-significative par rapport au stock initial des métaux dans le sol, puisqu'elle ne dépasse pas 0.21 % de Zn, 0.28 % de Pb et 0.25 % de Cu du stock initial dans le sol. Ceci indique que dans ce dispositif de traitement, le mécanisme de la phytoaccumulation n'est impliqué que de manière

marginale. La fraction accumulée dans les plantes apparaît faible par rapport à la fraction totale extraite du sol (7 à 82 %) si l'on tient compte de l'extraction dans le sol au niveau du système racinaire (Tableau IV.4). Ceci suggère que dans ce dispositif de traitement, l'extraction des métaux du sol est due majoritairement à leur lixiviation. Le principal mécanisme impliqué dans la décontamination du sol dans ce dispositif apparaît donc un phénomène de la lixiviation, induite par l'action des plantes, et plus précisément par l'activité racinaire, en conjonction avec l'irrigation (plus le citrate lorsqu'il est appliqué), qui peut être désignée par le terme *phytolixiviation*.

IV.3. Phytolixiviation des métaux

La migration des métaux vers les lixiviats au cours du traitement a été confirmée par les mesures des concentrations dans les lixiviats prélevés périodiquement lors de la phytoremédiation. Il faut noter que, puisque le dispositif des casiers ne permettait pas le prélèvement direct des lixiviats dans les drains, les prélèvements mesurés ont été effectués dans les regards situés à la sortie des casiers et contenant des mélanges des lixiviats issus des sols de trois espèces végétales, car le dispositif ne permet pas de les séparer (cf. Partie II.3.1, Chapitre II). Les prélèvements mesurés ont été préalablement filtrés à 0.45 µm, ils ne tiennent donc compte que des éléments dissous et des éléments sous forme de particules extrêmement fines (cf. Partie II.3.5, Chapitre II). Par ailleurs, les prélèvements mesurés n'ont pas été continus, mais très espacés dans le temps, ce qui ne permet pas de s'assurer s'ils sont quantitativement représentatifs de la lixiviation dans le temps pour toute la durée d'expérience. En outre, bien que les apports totaux en eau puissent être grossièrement estimés, l'irrigation des casiers a été très contrastée, et il est difficile de savoir quels volumes d'eau ont réellement percolé dans le sol, et à quels moments, et quelle est la part d'évapotranspiration. Les mesures périodiques des concentrations des éléments et des paramètres physico-chimiques (Eh, pH) dans les lixiviats, mises en parallèle avec les résultats de l'étude de la spéciation, permettent de décrire le phénomène de la lixiviation au cours du traitement de façon qualitative (cf. Chapitres V, VI), mais elles ne sont pas suffisantes pour établir en toute rigueur un bilan quantitatif du flux de la lixiviation.

Pour obtenir une information quantitative sur la part de la lixiviation dans ce dispositif, le flux de la lixiviation est estimé par l'établissement d'une balance de masse des métaux, pour chaque compartiment végétalisé, à partir des mesures directes des métaux dans le sol et dans les plantes. La quantité lixiviée est estimée par la différence entre la variation de stock des métaux dans le sol et la quantité accumulée dans les plantes par compartiment végétalisé. La masse du sol sec par compartiment à l'état initial avant phytoremédiation a été

estimée à 1881 kg, à partir du volume total de sol mis dans les casiers et des dimensions des casiers (cf. Partie II.2.2., Chapitre II). Cependant, il est difficile d'estimer la masse du sol après seize mois de phytoremédiation. Il est probable qu'elle a diminué suite au traitement puisqu'un tassement de la couche de sol a été observé, et les fractions fines du sol ont pu migrer vers les lixiviats. Pour s'affranchir de cette difficulté, la balance de masse entre l'état initial et l'état final est établie par unité de masse de sol, soit pour un kilogramme de sol (Tableau IV.7).

Le sol initial avant phytoremédiation a été homogénéisé et, comme nous l'avons vu précédemment, peut être considéré comme homogène. Le stock initial des métaux dans un kilogramme de sol avant phytoremédiation est calculé comme la moyenne des concentrations mesurées dans le sol des casiers, après l'homogénéisation, la mise en dépôt et avant la plantation du sol.

Pour calculer le stock résiduel des métaux dans le sol après phytoremédiation, il est nécessaire de tenir compte de l'hétérogénéité du sol induite par le traitement, et de considérer l'ensemble du sol dans un compartiment végétalisé. Les volumes de deux types de sol représentant l'ensemble du sol d'un compartiment à l'état final, à savoir le sol au niveau du système racinaire (sol rhizosphérique + sol non-rhizosphérique moyen) et le sol en dehors du système racinaire (sol non-rhizosphérique extrême), ne peuvent pas être mesurés directement. Néanmoins, il est possible d'estimer leurs proportions relatives dans le volume total de sol d'un compartiment, à partir des dimensions du compartiment, de la profondeur de la couche de sol, de la densité de plantation et des caractéristiques des systèmes racinaires. Chaque compartiment végétalisé est d'une superficie de $4 \times 1.3 \text{ m}^2$ en surface et de $1 \times 0.3 \text{ m}^2$ au fond, il contient au fond une couche de gravier de 0.5 m d'épaisseur (massif drainant) et par-dessus une couche de sol de 0.5 m d'épaisseur. Le volume total de sol dans un compartiment est de 1.8 m^3 . Le sol est végétalisé avec 10 plantes soit une densité de 2 plantes par m^2 (cf. Partie II.2, Chapitre II). En seize mois de culture, de mai 2002 à septembre 2003, les plantes ont accompli un cycle végétal annuel complet plus un été. Elles ont développé des systèmes racinaires de grandes tailles, extensifs, ramifiés et denses (cf. Figure II.8, Chapitre II). Les longueurs des racines mesurées à la fin de la phytoremédiation sont d'environ 40-60 cm pour les trois types de plantes. Si l'on tient compte de la profondeur initiale de la couche de sol (0-50 cm) et du tassement du sol observé après seize mois de traitement, on peut considérer que les racines ont exploité toute la profondeur de la couche de sol. A partir de la longueur racinaire mesurée, et de la densité et l'architecture des systèmes racinaires observées à la fin de la phytoremédiation, en moyenne pour trois types de plantes, le volume de sol colonisé par le système racinaire d'une plante peut être exprimé approximativement par un cube de dimensions $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ m}$ et de volume de 0.125 m^3 . Le volume de sol colonisé par les systèmes racinaires de 10 plantes dans un compartiment

peut être estimé alors à 1.25 m^3 , ce qui correspond à 70 % de volume total de sol dans un compartiment (1.8 m^3). Par la différence entre le volume total de sol dans un compartiment et le volume de sol au niveau du système racinaire, le volume de sol en dehors du système racinaire peut être estimé à 0.55 m^3 soit 30 % de volume total de sol. Le stock résiduel des métaux dans le sol est calculé alors comme la moyenne entre le sol au niveau du système racinaire et le sol en dehors du système racinaire, pondérée par les proportions relatives de ces sols dans le volume total de sol dans un compartiment.

Tableau IV.7. Balance de masse des métaux (mg) établie pour un kilogramme de sol (MS).

Stock initial dans le sol ^a		Stock résiduel dans le sol ^b					
		Casier Témoin			Casier Citrate		
		Iris	Phragmites	Salix	Iris	Phragmites	Salix
Zn	2171	1367	788	1380	1106	639	941
Pb	607	474	273	482	447	255	434
Cu	380	349	202	362	274	160	222
Quantité extraite du sol ^c							
Quantité phytoaccumulée ^d		Quantité lixiviée ^e					
		Casier Témoin			Casier Citrate		
		Iris	Phragmites	Salix	Iris	Phragmites	Salix
Zn	<5	803	1383	787	1065	1532	1226
Pb	<2	133	334	125	160	352	172
Cu	<1	31	178	19	106	220	157

^a Moyenne calculée sur les quatre échantillons de sol prélevés chacun dans les quatre casiers du site pilote après l'homogénéisation, puis la mise en dépôt du sol et avant la plantation.

^b Moyenne entre le sol au niveau du système racinaire (sol rhizosphérique + sol non-rhizosphérique moyen) et le sol en dehors du système racinaire (sol non-rhizosphérique extrême), pondérée par les proportions estimées de ces sols (70 et 30 %, respectivement) dans le sol total d'un compartiment végétalisé à la fin de la phytoremédiation.

^c Quantité calculée par la différence entre le stock initial et le stock résiduel.

^d Quantité calculée comme le produit de la fraction phytoaccumulée (F_p) par le stock initial.

^e Quantité calculée par la différence entre la quantité extraite et la quantité phytoaccumulée.

La différence entre le stock initial et le stock résiduel correspond à la quantité totale extraite du sol, qui englobe la quantité accumulée dans la biomasse (racines plus parties aériennes) des plantes (quantité phytoaccumulée) et la quantité lixiviée dans les eaux de drainage. Comme nous l'avons vu précédemment, d'après les mesures directes dans le sol et dans les plantes, la fraction phytoaccumulée apparaît non-significative par rapport au stock initial des métaux dans le sol. Exprimée en quantité extraite d'un kilogramme de sol pour chaque élément, elle se situe dans l'intervalle entre la valeur minimale obtenue pour le phragmite dans le casier témoin et la valeur maximale obtenue pour le saule dans le casier citrate : 0.7-4.6 mg de Zn, 0.1-1.7 mg de Pb, et 0.2-1.0 mg de Cu. Globalement, pour les plantes utilisées, la quantité phytoaccumulée d'un kilogramme de sol ne dépasse pas <5 mg de Zn, <2 mg de Pb, <1 mg de Cu, ce qui apparaît faible par rapport à la quantité totale extraite du sol. La quantité estimée lixiviée se situe dans l'intervalle entre la valeur minimale obtenue pour le saule dans le casier témoin et la valeur maximale obtenue pour le phragmite dans le casier citrate : 787-1532 mg de Zn, 125-352 mg de Pb et 19-220 mg de Cu. Il apparaît donc, d'après la balance de masse, que la quasi-totalité des métaux extraits du sol dans le dispositif des casiers peut être considérée comme lixiviée. Il convient de garder à l'esprit qu'il s'agit d'une estimation approximative de la quantité lixiviée, car le sol est hétérogène du fait du gradient d'influence racinaire, et les volumes de sols en dehors et au niveau du système racinaire sont estimés approximativement. La balance de masse peut d'ailleurs être calculée séparément pour le sol en dehors du système racinaire et pour le sol au niveau du système racinaire, et ainsi être considérée dans une fourchette. Néanmoins, ceci ne change pas la donne, et il ressort clairement que dans ce dispositif la part de la phytolixiviation est quantitativement nettement supérieure à la phytoaccumulation. Il serait intéressant, à titre de perspective, de compléter cette étude par une mesure directe du flux de la lixiviation à partir des lixiviats, en réalisant l'expérience de phytoremédiation dans un dispositif optimisé et adapté à l'échantillonnage direct et continu des lixiviats dans les drains.

Peu d'études en phytoremédiation *in situ*, y compris en phytoextraction induite par des chélatants, analysent la lixiviation des métaux suite à la phytoremédiation. Généralement, les rendements de phytoextraction sont présentés en termes de teneurs des métaux dans le sol et des quantités des métaux extraits par la biomasse végétale récoltable. Les rendements mentionnés sont très variables et difficilement comparables, car ils dépendent des conditions d'expérimentation, de la plante, du nombre de récoltes, de la nature du sol, du niveau et de la nature de la pollution, etc., et ne peuvent pas être généralisés à tous les cas de figure. Toutefois, généralement, la part des métaux qui est extraite du sol par la biomasse récoltable dans une récolte est rarement supérieure à 1 %. Or, comme il est possible de constater dans notre cas, la lixiviation des métaux suite à la

phytoremédiation peut être significative. Les rendements de dépollution des sols par phytoextraction sont ainsi quelquefois surévalués, car, dans certains cas, outre l'extraction par la biomasse, ils comprennent des pertes (non évaluées) des métaux *via* la lixiviation. C'est le cas, par exemple, d'une démonstration de « phytoextraction » de Pb du site de Magic Marker à New Jersey, *in situ* avec deux récoltes consécutives de *Brassica juncea* plus une récolte de *Helianthus annuus*, en présence de l'EDTA, lorsque les taux importants d'extraction de l'ordre de 28 % de Pb dans le sol ont été obtenus, qui sont par ailleurs comparables à ceux obtenus dans notre étude, et qui n'ont été en effet dus qu'à 4 % à l'extraction par les biomasses des plantes (Rock, 2003). Un autre exemple démonstratif peut être apporté à titre de référence. Anderson (2000) établit la balance de masse de Cd pour un essai de phytoextraction *in situ* avec *Brassica juncea* assistée par l'apport de l'EDTA. L'EDTA a été appliquée au sol durant deux semaines, au début de la floraison des plantes. Au bout de deux semaines, la masse de Cd dans le sol a diminué de 3670 mg à 3190 mg (-480 mg soit 14 %) dans la couche de sol de profondeur 0-5 cm, et de 2000 mg à 2270 mg (+270 mg soit 12 %) dans la couche de profondeur 5-10 cm. L'accumulation de Cd dans la biomasse a été de 7.3 mg. Ainsi, 480 mg de Cd ont été lixiviés de la couche 0-5 cm du sol, 270 mg ont été retrouvés dans la couche 5-10 cm du sol, et 7.3 mg ont été extraits par la biomasse. La perte nette en Cd pour 0-10 cm de sol est alors de 203 mg, cette quantité a été lixiviée hors de 0-10 cm de sol (Anderson, 2000; Anderson, 2005). Comme dans notre cas, la lixiviation est nettement supérieure à l'extraction par les plantes. Ces travaux montrent qu'il est important d'évaluer la lixiviation lors des expériences de phytoremédiation *in situ*, et d'établir systématiquement les bilans des flux, comme c'est couramment pratiqué par les agronomes, par exemple. La lixiviation « naturelle » des métaux est couramment observée en conditions naturelles pour différents types de sol, et dans les sols sous les cultures agricoles, par exemple. Elle varie fortement selon l'élément, le type de sol, pH et Eh du sol, et d'autres facteurs qui déterminent la solubilité de l'élément. L'apport des chélatants au sol ne peut que favoriser la solubilisation et induire la lixiviation. Cependant, cette lixiviation « induite », lorsqu'elle se produit *in situ*, dans les conditions de plein champ, et lorsque les mesures de prévention ne sont pas prises, ne contribue pas à la dépollution, mais seulement à un déplacement de la pollution vers les horizons plus profonds de sol et vers les nappes.

Le bilan de la phytoremédiation sur le site pilote, établi à l'échelle macroscopique, en termes de concentrations totales, pour la période de seize mois, montre que dans le dispositif des casiers, les plantes utilisées accumulent peu de métaux dans leurs tissus, elles favorisent principalement la remobilisation des métaux dans le sol et leur lixiviation. Grâce à leurs systèmes racinaires de grandes tailles, puissants et ramifiés, ces plantes de milieux humides obtiennent un grand volume de la rhizosphère, qui est le siège de fortes activités

chimiques et biologiques. La phytolixiviation des métaux dans ce dispositif de traitement est due pour une part à l'effet de la plante, et plus particulièrement à l'activité racinaire. Par ailleurs, les sols des casiers ont été soumis aux conditions d'alternance hydromorphie/assèchement par le biais de l'irrigation susceptible de provoquer des cycles réduction/oxydation et de favoriser ainsi la dissolution des phases porteuses des métaux sensibles au redox et la lixiviation des métaux libérés. Ainsi, la phytolixiviation peut être due également à l'effet abiotique de l'irrigation contrastée. L'absence du casier soumis à l'irrigation sans plantes ne permet pas de dissocier l'effet de la plante et l'effet de l'irrigation. Dans le casier citrate, un troisième paramètre, l'effet du citrate, se rajoute à l'effet combiné de la plante et de l'irrigation. Dans ce dispositif des casiers la phytolixiviation est due vraisemblablement aux effets conjugués des plantes et de l'irrigation (plus le citrate lorsqu'il est appliqué). Le bilan et les effets de la phytoremédiation seront discutés dans les chapitres suivants en termes de formes chimiques et structurales sous lesquelles se trouvent les métaux, en particulier le zinc et le cuivre, dans le sol avant et après phytoremédiation (cf. Chapitre V, Chapitre VI).

La quantité lixiviée des métaux par compartiment du casier caractérise le rendement de phytolixiviation de l'espèce végétale en conjonction avec l'irrigation (plus le citrate lorsqu'il est appliqué) pour une densité de plantation de 2 plantes/m² (toutes choses pouvant être considérées égales par ailleurs). Selon les tendances observées sur le site pilote, dans ces conditions, *Iris pseudacorus* (espèce iridacée) et *Salix viminalis* (espèce salicacée) ont des rendements de phytolixiviation similaires. Par rapport à ces deux espèces, la graminée *Phragmites australis* a un rendement de phytolixiviation apparemment supérieur. Sans traitement au citrate, la quantité lixiviée avec le phragmite est environ 2 fois (Zn), 3 fois (Pb) et 5 à 9 fois (Cu) plus élevée que celles obtenues avec l'iris et le saule (Tableau IV.7). Le traitement au citrate favorise la phytolixiviation des métaux dans l'ordre d'affinité : Cu > Zn > Pb, pour les trois espèces végétales. L'effet du citrate apparaît plus prononcé pour le saule et l'iris que pour le phragmite, ce qui permet de diminuer l'écart entre le rendement de ces deux plantes et celui du phragmite. Ainsi, avec traitement au citrate, la quantité lixiviée avec le phragmite devient environ 1.3 fois (Zn), 2 fois (Pb) et 2 fois (Cu) plus élevée par rapport à l'iris et au saule (Tableau IV.7). Or, même sans traitement au citrate, les quantités lixiviées de Zn, Pb et Cu avec le phragmite sont plus élevées que celles obtenues avec l'iris et le saule avec traitement au citrate. A partir de ces tendances, il apparaît que parmi les plantes testées, dans les conditions de cette expérimentation et sur le laps de temps considéré, la graminée *Phragmites australis* serait la plus appropriée pour la phytolixiviation dans le dispositif des casiers. Comme nous l'avons vu précédemment, le sol au niveau du système racinaire du phragmite est 2.5 fois plus riche en carbone organique que

ceux de l'iris et du saule, ce qui suggère que la rhizosphère du phragmite est plus active chimiquement et biologiquement et plus réactive vis-à-vis des phases porteuses des métaux. Il faut noter que la densité de plantation du phragmite, pratiquée sur ce site pilote (2 plantes/m²), est relativement faible par rapport à la densité habituellement pratiquée dans les procédés type « filtres plantés de roseaux » (8 plantes/m²). Dans les conditions des casiers, la densité de plantation du phragmite peut être augmentée jusqu'à 6 plantes/m² sans risque d'expansion excessive. L'augmentation de la densité de plantation du phragmite permettrait probablement d'obtenir le rapport efficacité/coût de traitement plus avantageux qu'avec l'ajout du citrate.

Selon les résultats obtenus pour ce sol et dans les conditions de cette expérimentation, la phytoremédiation avec *Phragmites australis* dans le dispositif des casiers permet d'atteindre, en seize mois soit un cycle végétal annuel complet plus un été, en moyenne pour le sol du compartiment végétalisé, un rendement de phytolixiviation de 1383-1532 mg/kg de Zn, 334-352 mg/kg de Pb et 178-220 mg/kg de Cu, sans et avec traitement au citrate, respectivement. Comme nous l'avons vu précédemment, au bout de seize mois de croissance végétale, le volume de sol au niveau du système racinaire peut être estimé majoritaire dans le volume total de sol dans un compartiment. Pour une appréciation générale de la capacité de phytolixiviation du phragmite, il semble raisonnable de considérer les taux de rendement obtenus dans le sol au niveau du système racinaire, car le système racinaire du phragmite se reproduit d'une manière très importante et rapide, par multiplication des rhizomes en réseau. A titre d'exemple, une plantule du phragmite installée dans une zone humide peut donner, en un an, une roselière de 15 m² et, en deux ans, plus de 70 m² (Fustec and Lefeuvre, 2000). C'est à cause de sa grande capacité d'expansion que le phragmite est considéré comme une espèce envahissante. Le caractère envahissant du phragmite présente d'ailleurs des risques potentiels de propagation de cette plante, ce qui limite l'intérêt de son utilisation en conditions de pleins champs.

Si l'on fait l'hypothèse que les taux d'extraction obtenus dans le sol au niveau du système racinaire du phragmite en seize mois soit un cycle végétal annuel complet plus un été (75, 71, 65 % de Zn, Pb, Cu, sans citrate, et 82, 76, 76 % de Zn, Pb, Cu, avec citrate) seront maintenus au-delà de cette période, en tenant compte de la configuration du casier et du fort potentiel d'expansion du système racinaire du phragmite, on pourrait estimer, à titre de prévision approximative, qu'une deuxième année de phytoremédiation avec phragmite (deuxième cycle végétal annuel complet) dans ce dispositif permettrait d'atteindre les teneurs résiduelles en métaux dans le sol d'environ 197 mg/kg en Zn, 79 mg/kg en Pb, 71 mg/kg en Cu, sans traitement au citrate ; et 115 mg/kg en Zn, 61 mg/kg en Pb 38 mg/kg en Cu, avec traitement au citrate. Ces teneurs sont comparables à des teneurs agricoles habituelles dans les sols agricoles français (88 mg/kg en Zn, 54 mg/kg en Pb, 28 mg/kg en

Cu (Baize, 2000), cf. Tableau I.3, Chapitre I). D'après cette estimation, environ deux années de traitement avec phragmite seraient nécessaires pour dépolluer ce sol dans le dispositif des casiers, sous condition de reproduire les mêmes facteurs stationnels d'expérimentation (configuration du système, mode d'arrosage, etc.). Toutefois, cette estimation doit être considérée avec précaution, car elle est réalisée avec nombre d'approximations, et avant toute extrapolation des résultats obtenus dans les conditions de cette expérimentation, il semble nécessaire, à titre de perspective, de compléter cette étude par une validation au niveau temporel, en poursuivant l'expérience de la phytoremédiation sur plusieurs années. Le suivi à plus long terme permettrait de vérifier cette estimation du temps potentiellement nécessaire, et de déterminer le temps effectivement nécessaire pour obtenir une dépollution satisfaisante de ce sol dans le dispositif des casiers.

IV.4. Conclusion

Les résultats des essais sur le site pilote montrent que la phytoremédiation dans le dispositif des casiers végétalisés avec des plantes de milieux humides selon le principe de Jardins Filtrants offre un bon potentiel pour décontaminer un sol contenant une pollution polymétallique.

Le bilan de la phytoremédiation établi pour la période de seize mois, d'après les mesures des métaux dans le sol et dans les plantes, montre que le principal mécanisme impliqué dans la décontamination dans ce dispositif est la **phytolixiviation**. Les plantes de milieux humides testées dans ce travail, en particulier *Iris pseudacorus*, *Phragmites australis* et *Salix viminalis*, n'accumulent dans leurs tissus qu'une faible fraction des métaux, qui est non-significative par rapport au stock initial dans le sol (<0.3 % pour chaque métal et pour chaque type de plantes, sans ou avec citrate). En revanche, l'action combinée des plantes et de l'irrigation permet de remobiliser et lixivier une fraction importante de métaux dans une période de temps relativement courte. Les lixiviats sont collectés, grâce au dispositif de drains, puis piégés dans un filtre en tourbe végétalisée, d'un volume réduit. Pour information, le mécanisme de piégeage du cuivre dans cette tourbe a été étudié dans la thèse de A. Matynia (2009).

Trois plantes de milieux humides testées sur le site pilote ont montré de bonnes capacités de phytolixiviation. D'après les tendances observées sur ce site, *Iris pseudacorus* et *Salix viminalis* ont des capacités similaires. Par rapport à ces deux plantes, la capacité de phytolixiviation de la graminée *Phragmites australis* apparaît supérieure, permettant d'éliminer jusqu'à 75 %, 71 % et 65 % de Zn, Pb et Cu, respectivement, dans le sol au niveau du système racinaire, en seize mois soit un cycle végétal annuel complet plus un été,

dans les conditions de cette expérimentation. Toutefois, vu le faible nombre d'échantillons pratiqué sur le site pilote et l'absence de répétitions des différents traitements, cette conclusion semble être difficilement généralisable.

L'ajout du citrate au système sol-plante apporte un effet supplémentaire à l'effet des plantes et de l'irrigation, en favorisant la remobilisation et la lixiviation des métaux dans l'ordre d'affinité : $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Pb}$. Ces résultats obtenus sur le site pilote sont en accord avec les résultats obtenus au laboratoire lors des essais du citrate sur le sol sans plantes. L'action du citrate n'induit apparemment pas l'accumulation des métaux dans les parties aériennes des plantes, mais favorise leur lixiviation du sol. En outre, l'ajout du citrate ne produit pas d'effet toxique apparent sur la production de la biomasse des plantes, leur croissance et leur physiologie.

Dans le dispositif du site pilote, la phytoremédiation avec *Phragmites australis*, avec une densité de plantation de 2 plantes/m², a permis d'atteindre, en un cycle végétal annuel complet plus un été, en moyenne pour le sol du compartiment végétalisé, un rendement de phytolixiviation de 1383-1532 mg/kg de Zn, 334-352 mg/kg de Pb et 178-220 mg/kg de Cu, sans et avec l'ajout du citrate, respectivement. D'après une estimation, à titre de prévision approximative, tenant compte de la configuration des casiers et du fort potentiel d'expansion du système racinaire du phragmite, dans ce dispositif, environ deux années de traitement avec cette plante seraient nécessaires pour abaisser les teneurs en métaux dans ce sol jusqu'à un niveau comparable avec des teneurs habituelles dans les sols agricoles français.

La phytoremédiation avec ces plantes de milieux humides dans le dispositif des casiers peut être appliquée à des différentes matrices polluées (sols, sédiments, boues). Le dimensionnement des casiers permet de moduler le volume et l'épaisseur de la matrice à traiter, ainsi que la composition et l'épaisseur du massif drainant. Par ailleurs, la densité de plantation des casiers peut être modulée, et augmentée en l'occurrence pour atteindre le meilleur rendement. Par exemple, la plantation de *Phragmites australis* peut être augmentée jusqu'à 6 plantes/m² sans risque d'expansion excessive. Enfin, la phytoremédiation dans le dispositif des casiers étanches permet de contrôler les conditions de traitement, de prévenir les risques de dispersion des polluants dans l'environnement, et de réduire les risques de propagation des plantes envahissantes telles que le phragmite. Le développement à terme de cette solution de *phytolixiviation* ouvre une troisième voie pour la phytoremédiation, par rapport aux approches existantes telles que la phytoextraction et la phytostabilisation.

CHAPITRE V. Evolution de la spéciation du zinc suite à la phytoremédiation

*Le bilan de la phytoremédiation exprimé en teneurs totales fait ressortir un phénomène de la lixiviation des métaux du sol. Or, l'incorporation d'un métal dans le sol et son transfert impliquent in fine un changement de la spéciation. Les plantes et les microorganismes qui leur sont associés induisent les modifications physico-chimiques importantes dans la rhizosphère. L'effet de la rhizosphère modifie significativement la composition chimique de la solution du sol et peut conduire à la dissolution des phases porteuses des métaux, mais aussi à la précipitation d'autres phases immobilisant des métaux dans le sol rhizosphérique et à la surface des racines, comme par exemple des carbonates (Hinsinger, 1998a), du gypse (Jungk, 1991), des phosphates (Cotter-Howells and Caporn, 1996; Laperche et al., 1997; Panfili et al., 2005), des phyllosilicates et des phyllomanganates (Kodama et al., 1994; Egli et al., 2003; Lanson et al., 2008). Les plantes de milieux humides, vivant habituellement dans des conditions submergées en permanence ou de façon cyclique, libèrent de l'oxygène dans le sol par les racines pour s'adapter aux conditions anoxiques du milieu (Marschner, 1995). Ce phénomène, combiné à l'action des microorganismes (Emerson et al., 1999; Villalobos et al., 2003; Weiss et al., 2003), contribue à l'oxygénation de la rhizosphère et à la formation des oxyhydroxydes de Fe et de Mn (Armstrong et al., 2002). Ainsi, les macrophytes émergents comme *Phragmites australis* forment des « plaques » d'oxyhydroxydes de Fe et de Mn à la surface des racines. Des métaux comme le zinc, le plomb, le cuivre et l'arsenic ont été trouvés piégés dans ces « plaques » d'oxyhydroxydes (Otte et al., 1989; Ye et al., 1998; Hansel et al., 2001; Hansel et al., 2002).*

Dans ce chapitre et le chapitre suivant le bilan de la phytoremédiation est discuté en termes de formes chimiques et structurales sous lesquelles se trouvent les métaux, et en particulier le zinc et le cuivre, dans le sol avant et après phytoremédiation.

Ce chapitre présente l'étude des changements de spéciation du zinc induits par la phytoremédiation sur le site pilote après seize mois de traitement. L'objectif est de déterminer quelles sont les formes résiduelles de Zn dans le sol après phytoremédiation. Y a-t-il une formation de nouvelles espèces de Zn et quelles espèces de Zn ont pu être remobilisées et lixiviées lors de la phytoremédiation ? Rappelons que dans le sol initial le zinc a été présent sous cinq formes minérales : Zn-ferrihydrite, Zn-phosphate, Zn-kérolite, willémite et gahnite, en proportions de ~ 30, 28, 24, 11 et <10 %, respectivement, avec une précision de ± 10 % du zinc total (cf. Chapitre III).

*La spéciation du zinc après phytoremédiation a été étudiée à partir des échantillons de blocs non-remaniés d'une superficie de 150 cm² et de 5 cm d'épaisseur, prélevés à la fin de la phytoremédiation dans chaque compartiment végétalisé (*Iris pseudacorus*, *Phragmites australis*, *Salix viminalis*) du casier témoin et du casier citrate. Rappelons que les blocs non-remaniés sont constitués par un ensemble des racines, du sol situé à leur contact immédiat soit aux premiers millimètres qui les entourent (sol rhizosphérique) et du sol non-rhizosphérique proche et moyennement éloigné des racines (sol non-rhizosphérique moyen). Une partie de ces blocs a été conditionnée en lames minces de 30 μ m d'épaisseur, en vue de l'identification des phases zincifères à l'échelle du micromètre, à l'aide des techniques de micro-analyses (μ SXRF et μ EXAFS), l'autre partie a été séparée des racines, tamisée à 2 mm, broyée et conditionnée en pastilles, en vue de la quantification des phases zincifères dans le volume de sol par EXAFS sur poudre.*

V.1. Localisation des métaux

Dans un premier temps, les lames minces ont été imagées à l'échelle microscopique par micro-fluorescence X (μ SXRF) avec un faisceau de taille de $16\text{ (H)} \times 10\text{ (V)} \mu\text{m}^2$ à $5\text{ (H)} \times 5\text{ (V)} \mu\text{m}^2$ afin de localiser spatialement des métaux, de déterminer leurs associations géochimiques et de sélectionner les points d'intérêt pour les analyses μ EXAFS. Sur l'ensemble des lames minces, douze cartes de μ SXRF de dimension $10 \times 10\text{ mm}$ en moyenne ont été enregistrées avec une résolution $35 \times 35 \mu\text{m}^2$. A partir de ces cartes, les cartes fines ont été enregistrées avec une haute résolution $7 \times 7 \mu\text{m}^2$. Les cartes représentatives de la distribution des métaux dans les sols de trois plantes sont présentées sur la figure V.1. Dans cette présentation, à chaque élément est associée une couleur. L'intensité de la couleur étant proportionnelle à l'intensité de la fluorescence X de l'élément dans chaque pixel, la couleur moyenne de chaque pixel indique la présence et les proportions des éléments.

Les cartes de fluorescence X montrent une distribution hétérogène du zinc et du cuivre. La distribution de Zn dans le sol de *Iris pseudacorus* suggère l'existence de cinq formes morphologiques de Zn (Figure V.1 a,b). Une forme correspond au zinc concentré dans les racines, reconnaissables par leurs formes géométriques. Une autre forme de Zn représente des agrégats Zn-Fe de couleur violette (grain 13, par exemple) associés probablement aux poils racinaires ou aux champignons mycorhizes colonisant les racines. Une troisième forme de Zn correspond à des grains riches en Zn mais ne contenant pas de Fe (grains 6, 7), qui sont localisés au voisinage immédiat des racines. Enfin, une cinquième forme de Zn, avec le rapport Zn/Fe moins élevé que dans les agrégats Zn-Fe proches des racines, est distribuée dans la matrice minérale du sol plus éloigné des racines (Figure V.1 a).

A la différence du zinc, le cuivre n'est pas détecté dans les racines de l'iris. En revanche, au voisinage immédiat des racines, les grains riches en Cu de taille de $5\text{-}20 \mu\text{m}$ sont associés majoritairement avec des structures biologiques ressemblant à des filaments des mycorhizes arbusculaires. Il s'agit en effet des agrégats micrométriques composés de nanoparticules de Cu métallique (cf. Chapitre VI).

Le sol de *Salix viminalis* représente une matrice plus dense par rapport à celle de l'iris (Figure V.1 c). Cela vient du fait que nous n'avons pas pu obtenir des lames minces contenant des racines « fraîches » et bien différenciables du saule. L'objet aux contours verts (riche en Cu) au centre de la carte est un débris végétal en décomposition. La distribution des métaux dans cette matrice est similaire à celle dans la matrice du sol éloigné des racines dans les sols de l'iris et du phragmite. On y observe principalement une

association majoritaire Zn-Fe avec différentes proportions de Zn et de Fe selon les points. Néanmoins, la présence de petits grains riches en Zn et dépourvus de Fe, de taille de quelques micromètres (points 2, 3, 4, 8), localisés dans la matrice minérale suggère l'existence d'autres formes de Zn.

On observe le même type de grains de Zn dans le sol de *Phragmites australis* (points 1, 5, 9, Figure V.1 d). Par ailleurs, la coupe transversale de la racine du phragmite à haute résolution ($7 \times 7 \mu\text{m}^2$) montre que, d'une part, le zinc est présent à la surface de la racine : il y est associé au Fe formant une « plaque » de précipités d'oxydes de Fe (points 12, 14) (Figure V.1 e). D'autre part, le zinc est présent à l'intérieur de la racine : il est distribué de façon homogène dans la région centrale correspondant aux cylindres vasculaires de la stèle, et localisé ponctuellement sous forme d'agrégats dans les parenchymes corticaux (point 21). Ces observations suggèrent que la « plaque » d'oxydes de Fe à la surface des racines piège une partie de Zn, mais n'empêche pas pour autant le prélèvement et le transfert du zinc à l'intérieur de la racine jusqu'à la stèle.

Comme le zinc, le cuivre est associé avec le fer dans la « plaque » formée à la surface de la racine, mais en proportion moindre. A la différence du zinc, le cuivre n'est pas détecté dans la région centrale de la racine. En revanche, de nombreux grains de Cu de nature métallique (cf. Chapitre VI) sont localisés préférentiellement dans les parenchymes corticaux suggérant l'exclusion du cuivre au niveau du cortex (Figure V.1 e). Ces observations sont en accord avec les teneurs en cuivre mesurées dans les tissus du phragmite. Les teneurs en cuivre dans les parties aériennes sont très faibles (18-14 mg/kg), elles ne dépassent pas le seuil de la phytotoxicité du cuivre, et sont de 2 fois (en absence du citrate) à 8 fois (en présence du citrate) inférieures à celles dans les racines (cf. Chapitre IV). L'ensemble de ces résultats indique que *Phragmites australis* adopte le mécanisme interne de détoxification du cuivre en le séquestrant sous forme métallique non toxique, préférentiellement au niveau du cortex racinaire.

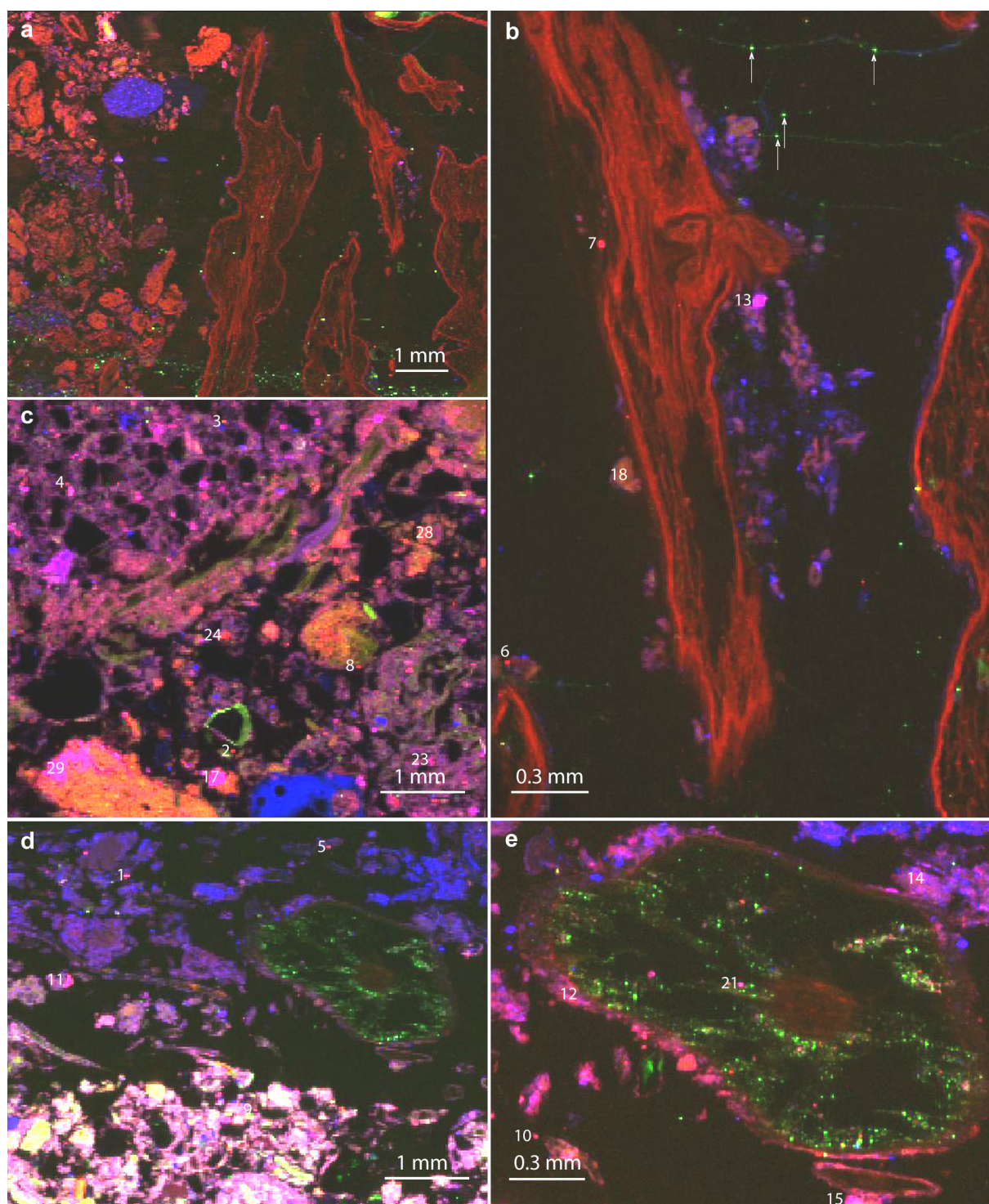


Figure V.1. Cartes tricolores de micro-fluorescence X (μ SXRF) montrant la distribution de Zn (rouge), Cu (vert) et Fe (bleu) dans les sols de *Iris pseudacorus* (a,b), *Salix viminalis* (c) et *Phragmites australis* (d,e). (a) Les structures rouges riches en Zn sont des racines de l'iris en coupe latérale (résolution $35 \times 35 \mu\text{m}^2$). (b) L'agrandissement d'une zone racinaire de (a) à haute résolution ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) montre que les racines sont riches en Zn mais ne contiennent pas de Cu détectable. Les flèches indiquent les grains de Cu localisés à l'extérieur des racines sur les filaments organiques typiques des champignons mycorhizes. (d) L'objet vert riche et Cu est une racine du phragmite en coupe transversale (résolution $20 \times 20 \mu\text{m}^2$). (e) L'agrandissement de la zone racinaire de (d) à haute résolution ($7 \times 7 \mu\text{m}^2$) montre que les grains de Cu sont concentrés dans le cortex racinaire, alors que la région de la stèle contient du zinc mais pas de cuivre. A la surface de la racine, Zn est associé principalement avec Fe formant une plaque de couleur violette (mélange de rouge et de bleu). Les numéros indiquent des points analysés par μ EXAFS au seuil de Zn.

V.2. Identification des espèces du zinc

Une fois les métaux localisés et leurs associations géochimiques identifiées, des spectres μ EXAFS au seuil K du zinc ont été enregistrés dans des points d'intérêt sélectionnés à partir des cartes de fluorescence X (Figure V.2). La focalisation du micro-faisceau sur un volume de quelques μm^3 accroît la probabilité d'isoler le signal EXAFS des espèces pures, et de les identifier directement en comparant leurs spectres EXAFS avec les spectres EXAFS des composés de référence. Quand un mélange d'espèces subsiste à cette échelle, l'enregistrement d'un grand nombre de spectres μ EXAFS ayant des proportions variables des espèces permet ensuite d'effectuer une analyse en composantes principales (ACP) afin de déterminer le nombre et la nature des espèces. La reconstruction des spectres par combinaison linéaire avec des espèces identifiées permet de déterminer les proportions de chaque espèce dans un mélange.

V.2.1. μ EXAFS

La figure V.2 a présente sept spectres représentatifs des grains riches en Zn de taille de 5 à 20 μm localisés dans différents emplacements dans les sols, à proximité ou à distance des racines selon les plantes. Au total, douze grains ayant un environnement cristallographique similaire aux points 1-7 ont été observés. En raison de la très petite taille de grains, les spectres de cinq autres grains ont un faible rapport signal/bruit et n'ont pas été inclus dans l'analyse. Les spectres représentatifs 1-7 sont regroupés en une famille puisqu'ils peuvent se décrire comme un système à deux composantes. Les spectres 1 et 2 sont quasiment identiques et correspondent à une espèce pure : le zinc métallique. Le spectre 7 correspond à une deuxième espèce pure : l'oxyde de zinc (ZnO). Les spectres intermédiaires, 3, 4, 5, et 6, correspondent aux mélanges de ces deux espèces en différentes proportions. Le zinc métallique et l'oxyde de zinc n'ont pas été présents dans le sol initial avant phytoremédiation. Leur origine dans le sol après phytoremédiation sera discutée dans la partie V.4 de ce chapitre.

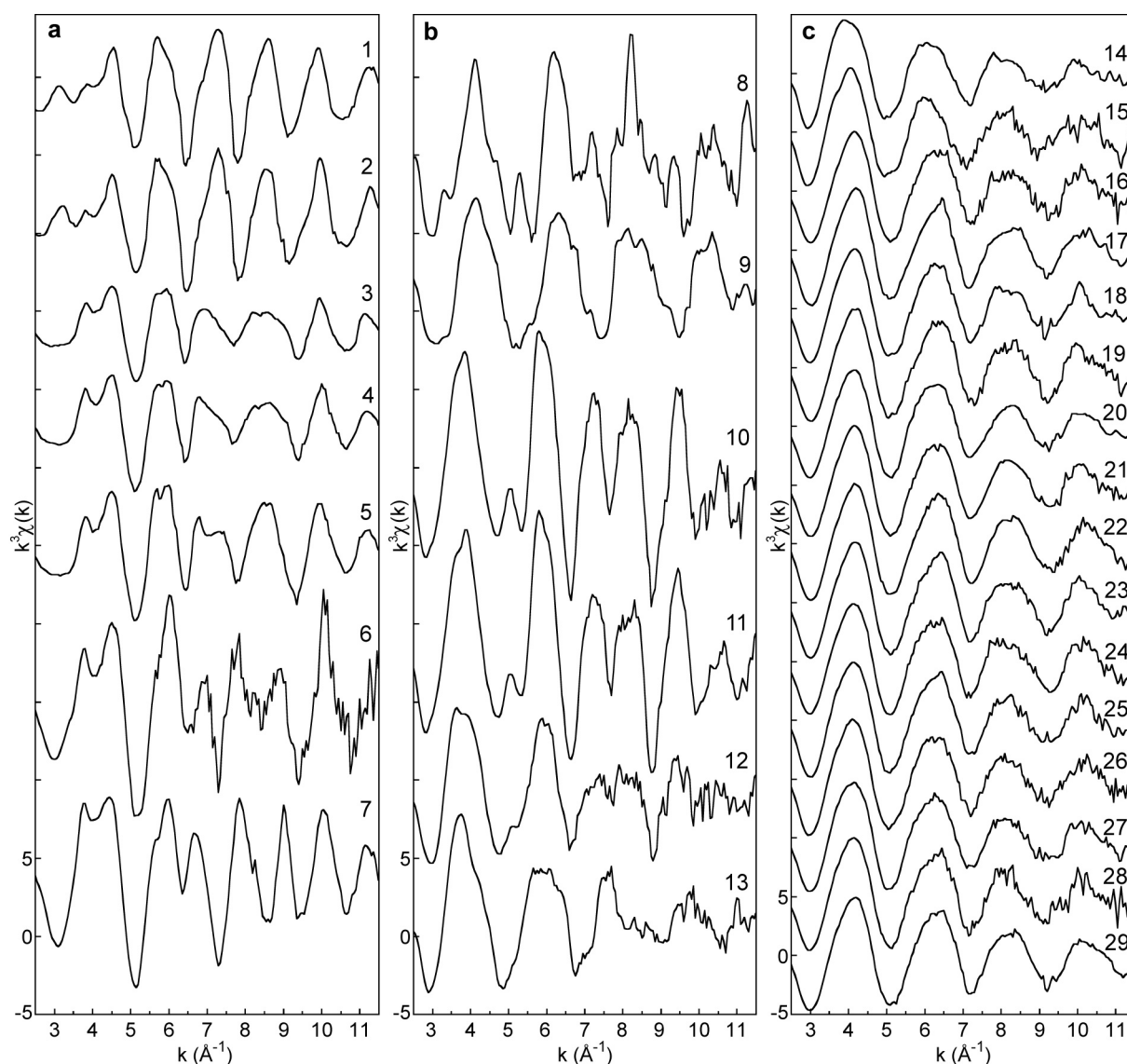


Figure V.2. Spectres μ EXAFS au seuil K de Zn enregistrés dans des points d'intérêt sélectionnés en μ SXRF. Le spectre 8 a été enregistré en mode de fluorescence, tous les autres spectres ont été enregistrés en mode de transmission.

La comparaison du spectre 1 avec le spectre de référence de Zn métallique montre que le spectre expérimental et le spectre de référence sont bien en phase et ont la même forme. Cependant, on observe une différence en amplitude entre ces deux spectres. L'amplitude du spectre de référence a été multipliée par 0.77 pour reproduire le spectre expérimental (Figure V.3 a). On observe les mêmes tendances pour le spectre enregistré en point 7. Ce spectre a la même forme et phase que le spectre de référence de ZnO. Cependant, l'amplitude du spectre de ZnO du sol est réduite de 49 % par rapport au spectre de référence (Figure V.3 b). La réduction de l'amplitude du signal EXAFS des grains de Zn et de ZnO du sol par rapport aux références ne semble pas provenir de l'effet de sur-absorption (anglais : overabsorption) lié à l'épaisseur, puisque les spectres de ces grains ont été

enregistres en mode de transmission. La réduction de l'amplitude peut être due à l'effet « trou » (anglais : hole effect) lié à la petite taille des particules constituant les grains. Cet effet se produit lorsque les particules sont petites (typiquement de taille micrométrique) par rapport à la taille du faisceau. Dans ce cas, la réduction de l'amplitude est linéaire dans l'espace k et dans l'espace R . Ce phénomène est observé pour le spectre 1 (Figure V.3 a,c), ce qui indique que le grain 1 du Zn métallique pur est constitué des particules bien cristallisées de taille micrométrique. En revanche, le spectre du grain 7 du ZnO pur et la transformée de Fourier de ce spectre montrent que la réduction de l'amplitude n'est pas linéaire dans l'espace k ni dans l'espace R (Figure V.3 c,d). Ce phénomène se produit généralement lorsque les particules constituant le grain sont typiquement de taille nanométrique. On observe alors dans l'espace k un amortissement des ondes, et dans l'espace R une perte des paires atomiques à grande distance. Ceci est caractéristique de la très petite taille (typiquement nanométrique) des particules et du désordre structural des particules (Dähn et al., 2002; Manceau et al., 2004; Manceau et al., 2005; Manceau et al., 2008). Ces résultats indiquent que les pôles purs de la famille des grains $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ sont de cristallinité différente : Zn métallique pur est microcristallin et ZnO pur est nanocristallin.

Le grain 7 contient l'oxyde de zinc pur. La morphologie nodulaire de ce grain et son emplacement à proximité immédiate de la surface de racine de l'iris en association vraisemblablement avec des poils racinaires ou des mycorhizes (Figure V.1 b) et le fait que ZnO n'a pas été présent dans le sol initial suggèrent ensemble que ZnO pourrait être formé par précipitation à la surface racinaire. Le même type de grains de ZnO ayant les spectres EXAFS identiques à celui du point 7 a été trouvé à la surface des racines d'une graminée terrestre, *Agrostis tenuis*, cultivée sur un sédiment contaminé par Zn (Panfili, 2004).

La comparaison du spectre 5 avec le spectre 1 (grain de Zn métallique pur) et le spectre 7 (grain de ZnO pur) montre que le spectre 5 est intermédiaire entre le spectre 1 et le spectre 7, et les trois spectres se croisent aux mêmes valeurs de k . Cela indique que le point 5 contient un mélange de deux espèces : Zn métallique et ZnO (Figure V.3. e). La reconstruction du spectre 5 par une combinaison linéaire de ces deux espèces montre en effet qu'il est bien reproduit avec 70 % de Zn métallique et 30 % de ZnO (Figure V.3 f). La réduction de l'amplitude du spectre 5 n'est pas linéaire dans l'espace k et intermédiaire entre le spectre 1 et le spectre 7. Ceci suggère que les particules constituant ce grain pourraient être de cristallinité variable.

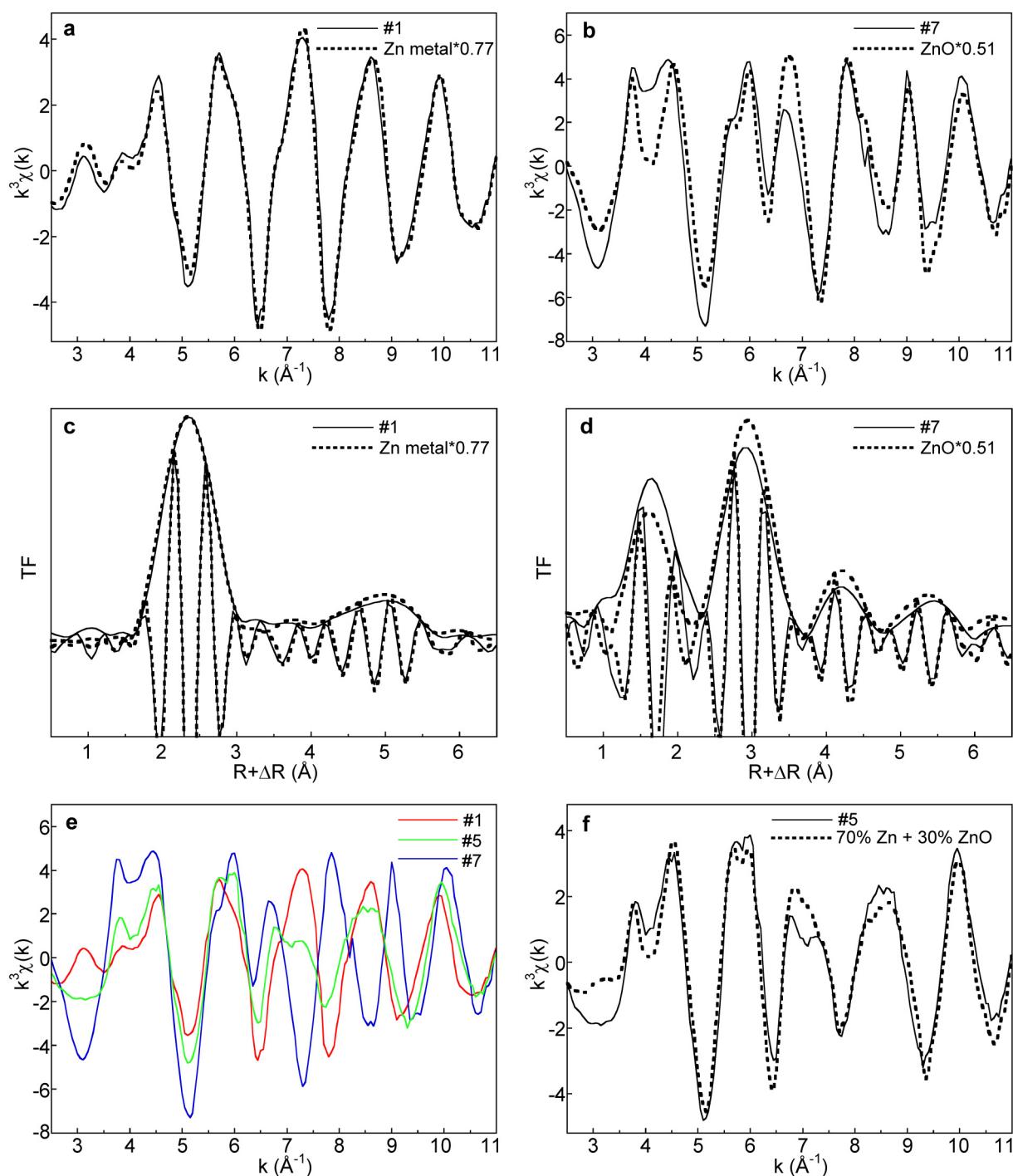


Figure V.3. Spectres μ EXAFS au seuil K de Zn enregistrés dans les points 1 et 7 (trait plein) et les spectres des références de Zn métallique et de ZnO (trait pointillé) (a, b) et leurs transformées de Fourier (TF) (c,d). L'amplitude des spectres des références de Zn métallique et de ZnO a été multipliée par 0.77 et 0.51 respectivement. (e) Comparaison des spectres μ EXAFS des points 1, 5 et 7. (f) Reconstruction du spectre μ EXAFS du point 5 par une combinaison linéaire de Zn métallique et de ZnO.

Comme le spectre 5, les spectres 3, 4 et 6 de la famille Zn^0 -ZnO ont été reconstruits par une combinaison linéaire de Zn métallique et de ZnO. La proportion relative de ZnO dans

les points 3 et 4 est similaire à celle dans le point 5 (~30 %). En revanche, dans le point 6 la proportion de ZnO augmente jusqu'à 65 % et, respectivement, la proportion de Zn métal diminue jusqu'à 35 %. Ces évolutions des proportions des espèces sont visibles sur les spectres. Le spectre 6 ayant la plus forte proportion de ZnO se rapproche alors en forme et en amplitude au spectre 7, qui correspond à ZnO pur. Si l'on compare entre eux les spectres 3, 4 et 5 contenant les mêmes proportions des espèces (70 % de Zn, 30 % de ZnO), on constate une variation d'amplitude des oscillations EXAFS. L'amplitude du spectre 5 est supérieure à l'amplitude des spectres 3 et 4. Cette variation d'amplitude des oscillations EXAFS est caractéristique d'une variation moyenne de la taille apparente des particules constituant les grains. Autrement dit, la cristallinité moyenne varie d'un grain à l'autre.

Si l'on regarde l'emplacement des grains de la famille $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ dans la rhizosphère, on constate que les grains 3, 4 et 5 contenant plus de Zn métallique que de ZnO sont relativement éloignés des racines (Figure V.1 c,d). En revanche, les grains 6 et 7 contenant 65 et 100 % de ZnO sont localisés à proximité immédiate des racines (Figure V.1 b). La présence des grains de Zn métallique pur, des grains de ZnO pur et des grains de mélange avec différents rapports $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ laisse supposer une différence des conditions locales à l'échelle de quelques dizaines de micromètres dans la rhizosphère, et l'influence de ces conditions sur la nature des grains. La présence des grains de Zn métallique pur et bien cristallisé dans les zones relativement éloignées des racines, l'augmentation du taux de ZnO avec le rapprochement des racines dans les particules $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ de cristallinité variable, et la présence des agrégats des nanoparticules de ZnO pur à proximité immédiate de la surface des racines pourraient suggérer l'oxydation graduelle des particules de Zn métallique et leur évolution en ZnO dans les zones oxygénées de la rhizosphère proches des racines. La corrosion des particules de Zn métallique à l'air et à la température ambiante avec la formation d'une couche de ZnO est connue et couramment utilisée dans la synthèse des nanostructures de $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO (Sun and Pan, 2004).

Outre Zn métallique et ZnO, cinq autres espèces de Zn ont été identifiées à l'état pur par μEXAFS : gahnite, willémitte, Zn-kérolite, Zn-goethite et Zn-phosphate.

Le spectre du point 8 est bien similaire au spectre de référence de la gahnite, le spectre du point 9 à celui de la willémitte, ce qui indique la présence de ces espèces dans les points analysés (Figure V.4). La gahnite (ZnAl_2O_4) et la willémitte (Zn_2SiO_4) ont été présentes dans le sol initial en faibles proportions : <10 % et ~11 % respectivement (cf. Chapitre III). Ces sont des minéraux primaires de Zn, leur persistance au traitement par phytoremédiation n'est pas surprenante.

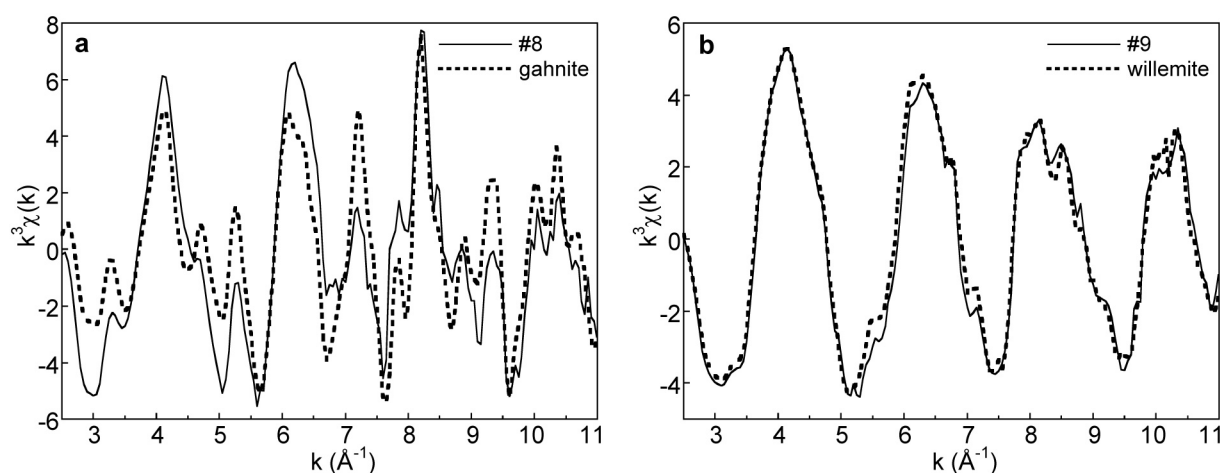


Figure V.4. Spectres μ EXAFS au seuil K de Zn enregistrés dans les points 8 et 9 (trait plein) et les spectres des références de la gahnite et de la willémite (trait pointillé). Spectre 8 a été enregistré en mode de fluorescence. La différence en amplitude entre le spectre expérimental et le spectre de référence est due à l'effet de la sur-absorption.

Les spectres enregistrés dans les points 10 et 11 sont quasiment identiques et parfaitement similaires au spectre de référence de Zn-kérolite 210, ce qui indique sans ambiguïté la présence de cette phase dans ces points (Figure V.5 a). Il s'agit d'un phyllosilicate riche en Zn de composition $\text{Si}_4(\text{Zn}_{2.1}\text{Mg}_{0.9})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ où le zinc est substitué au magnésium dans les sites octaédriques du réseau cristallin. Comme la gahnite et la willémite, l'espèce Zn-kérolite a été présente dans le sol initial, et elle persiste dans le sol après phytoremédiation.

Outre Zn métallique et ZnO, une troisième nouvelle espèce a été identifiée à l'état pur dans le point 13, à proximité immédiate de la racine de l'iris (Figure V.1 b). Il s'agit d'un oxyhydroxyde de fer zincifère, Zn-goethite substituée ($\alpha(\text{Fe,Zn})\text{OOH}$). La figure V.5 b montre la comparaison du spectre expérimental enregistré dans le point 13 avec le spectre du composé de référence de Zn-goethite. Ce composé de référence a été synthétisé par la dissolution de Zn-ferrihydrite avec 0.5 M KOH pendant 93 jours. Avec ce protocole, Zn et Fe libérés en solution coprécipitent en goethite où Zn est substitué au Fe dans les sites octaédriques $\text{Fe}(\text{O}_3(\text{OH})_3)$ du réseau cristallin (Manceau et al., 2000b). Les spectres de la goethite du sol et de la goethite synthétique sont identiques, ce qui indique que dans la goethite du sol le zinc est incorporé dans le réseau cristallin. L'incorporation de Zn dans la structure de la goethite, et le fait que Zn-goethite n'a pas été présente dans le sol initial, suggèrent que cette espèce s'est formée lors de la phytoremédiation par coprécipitation de Fe et de Zn libérés en solution suite à la dissolution des phases porteuses initiales.

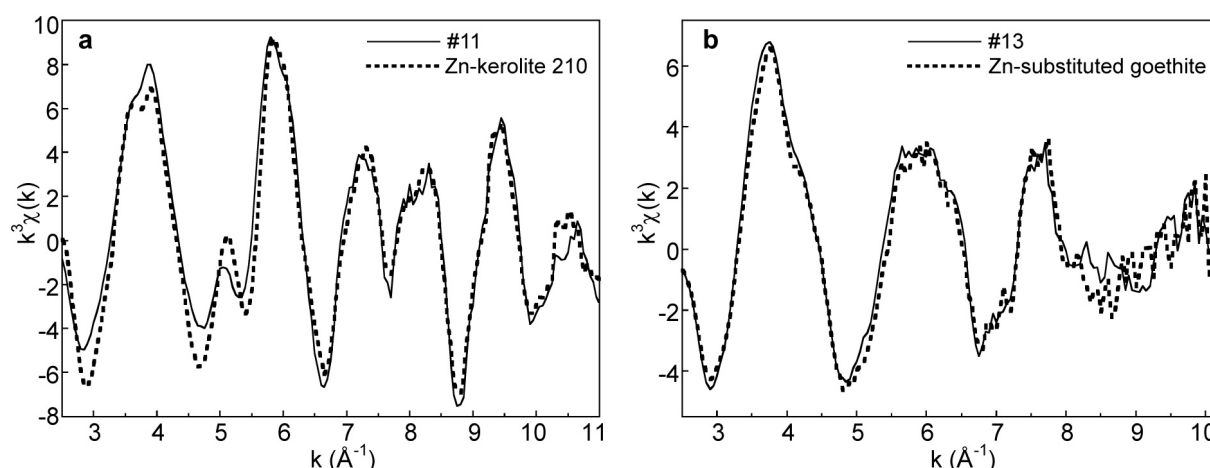


Figure V.5. Spectres μ EXAFS au seuil K de Zn enregistrés dans les points 11 et 13 (trait plein) et les spectres des références (trait pointillé) de Zn-kérolite et de Zn-goethite substituée (a,b).

La partie restante des spectres expérimentaux (14 à 29) caractérise les points les plus fréquemment rencontrés dans les sols analysés (Figure V.2. c). Les spectres enregistrés dans les points de 16 à 29 sont similaires, ce qui indique un environnement cristallochimique de Zn similaire dans ces points (Figure V.2 c). En effet, ces spectres, en grande majorité, sont bien reconstruits avec une seule espèce : Zn-phosphate. Un exemple représentatif de la reconstruction du spectre 21 est présenté sur la figure V.6 a. Ce spectre correspond à un précipité de Zn dans le cortex racinaire de *Phragmites australis*. Les spectres des points 14 et 15 correspondent aux précipités à la surface de la racine de *Phragmites australis* (Figure V.1 e). Ce deux spectres ont des allures similaires aux spectres 16-29, mais ils se distinguent par la forme et la position de la première et deuxième oscillation, ce qui indique un mélange de Zn-phosphate avec d'autres espèces dans ces points (Figure V.2 c). En effet, chacun de ces deux spectres est bien reconstruit par une combinaison linéaire de deux espèces : 63 % Zn-phosphate et 37 % Zn-goethite (point 14), et de 79 % Zn-phosphate et 21 % Zn-kérolite (point 15) (Figure V.6 b,c). Le spectre du point 12, correspondant à la « plaque » formée à la surface de la racine du phragmite, est bien reconstruit par combinaison linéaire de 54 % Zn-kérolite et 46 % Zn-goethite (Figure V.6 d).

En conjonction avec les teneurs en Zn mesurées dans les tissus végétaux, les résultats de μ EXAFS apportent des informations sur les mécanismes d'accumulation et de piégeage de Zn par *Phragmites australis*. Cette plante accumule relativement peu de Zn dans les parties aériennes (71 mg/kg), ce qui est typique des plantes tolérantes. L'excès de Zn toxique est séquestré au niveau des racines sous formes peu solubles et non toxiques. A l'extérieur des racines, le zinc est piégé dans les précipités racinaires sous forme de goethite, kérolite et phosphate. A l'intérieur des racines, le zinc est séquestré dans les cellules du cortex sous forme de phosphate.

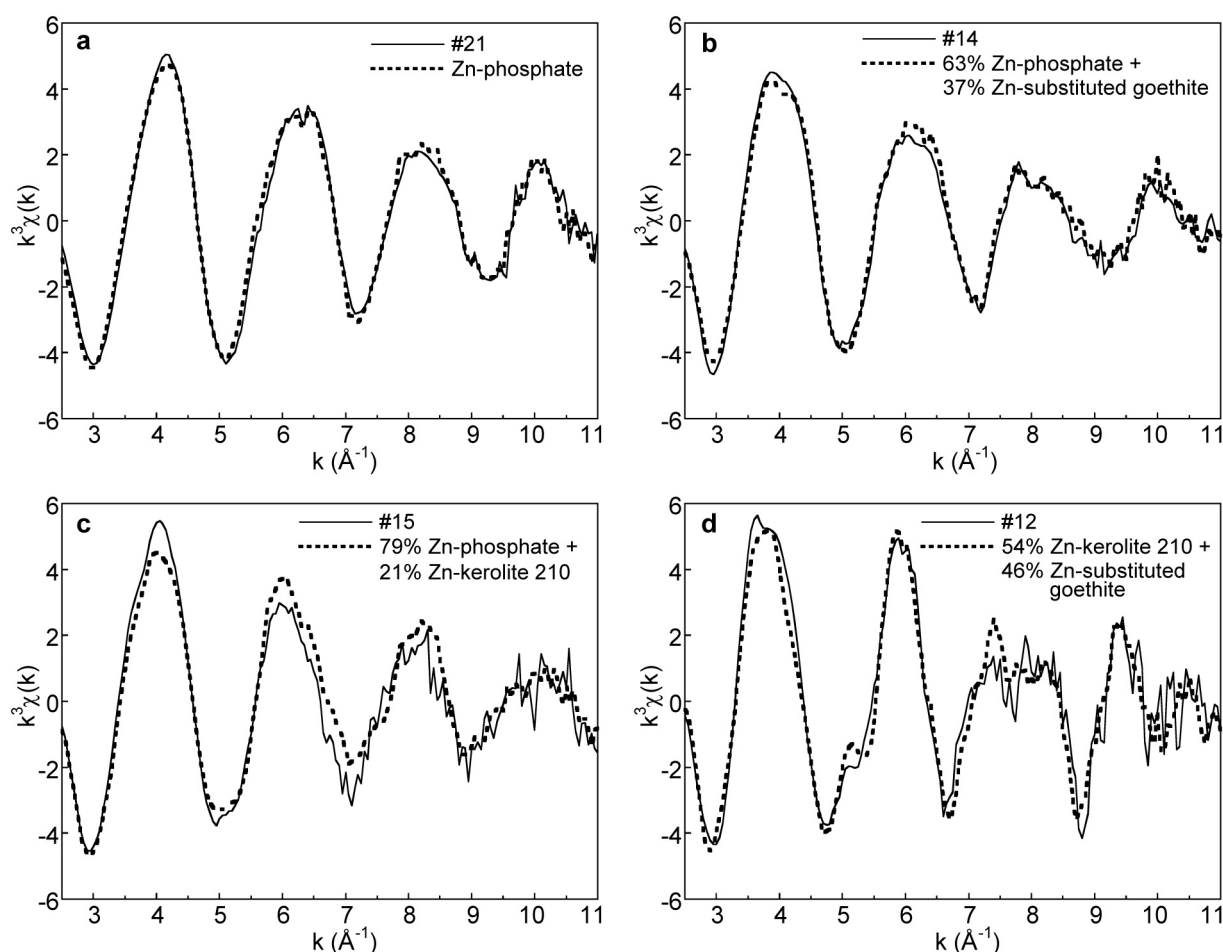


Figure V.6. Spectre μ EXAFS au seuil K de Zn du point 21 (précipité du cortex racinaire de *Phragmites australis*) et le spectre de référence de Zn-phosphate (a). Reconstructions des spectres μ EXAFS des points 14, 15 et 12 (précipités de surface racinaire de *Phragmites australis*) par combinaison linéaire de Zn-phosphate et Zn-goethite dans le point 14 (b), Zn-phosphate et Zn-kérolite dans le point 15 (c), Zn-kérolite et Zn-goethite dans le point 12 (d). Les spectres expérimentaux sont en trait plein, les spectres reconstruits sont en pointillé.

En résumé, les analyses μ EXAFS des sols après phytoremédiation ont permis d'identifier *in fine*, à l'échelle micrométrique, sept espèces zincifères : Zn métallique, oxyde de Zn, gahnite, willémitte, Zn-kérolite, Zn-goethite et Zn-phosphate. Parmi ces espèces, quatre espèces : gahnite, willémitte, Zn-kérolite et Zn-phosphate, ont été présentes dans le sol à l'état initial, ce qui suggère que ces espèces ont persisté à la phytoremédiation. Les résultats de μ EXAFS, en conjonction avec les résultats de micro-fluorescence X, montrent aussi que Zn-phosphate est distribué un peu partout avec une grande variabilité d'associations : dans la matrice du sol sous forme d'agrégats de morphologie et taille variables, à la surface des racines sous forme de précipités en association soit avec la goethite, soit avec la kérolite, ainsi que dans le cortex racinaire. Sachant aussi que le sol est riche en P ($[P_2O_5] = 0.8\%$ comparé à 0.05% en moyenne dans les sols (Lindsay et al.,

1989)), l'ensemble des résultats suggère que les phosphates initialement présents, y compris Zn-phosphate, pourraient être remobilisés et reprécipités lors de la phytoremédiation.

Trois nouvelles espèces : Zn métallique, oxyde de Zn, et Zn-goethite, ont été identifiées dans les sols après phytoremédiation. Une espèce, l'oxyde de Fe zincifère mal cristallisé (Zn-ferrihydrite), majoritaire dans le sol à l'état initial (30 % de zinc total), n'a pas été identifiée à l'échelle micrométrique dans le sol après phytoremédiation. En revanche, une autre forme d'oxyde de Fe zincifère, Zn-goethite substituée, s'est formée lors de la phytoremédiation. Ces résultats suggèrent la transformation de la ferrihydrite en goethite lors de la phytoremédiation.

V.2.2. Analyse en composantes principales

Le nombre et la nature des espèces de Zn identifiées par μ EXAFS ont été vérifiés par l'analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur l'ensemble de 29 spectres μ EXAFS expérimentaux.

Dans un premier temps, les résultats de l'ACP confirment que 7 composantes sont nécessaires et suffisantes pour décrire l'ensemble des spectres μ EXAFS. En effet, la valeur indicative *IND* atteint le minimum quand le nombre de composantes principales utilisées pour la reconstruction de l'ensemble des spectres est égal à 7 (Tableau V.1). La reconstruction de 29 spectres avec deux, trois, quatre, cinq, six et sept composantes a confirmé que 7 composantes sont nécessaires et suffisantes pour reconstruire l'ensemble des spectres.

Tableau V.1. Résultats d'analyse en composantes principales.

Composante	Eigenvalue	<i>IND</i> ^a
1	149.0	0.0263
2	78.8	0.0200
3	52.1	0.0159
4	34.6	0.0136
5	29.8	0.0108
6	19.2	0.0092
7	11.4	0.0090
8	9.5	0.0092
9	8.0	0.0093
10	7.8	0.0098

^a Valeur indicative (cf. Manceau et al., 2002b).

Dans un second temps, la reconstruction des spectres des composés de référence de notre base de données avec les sept composantes principales extraites des spectres μ EXAFS expérimentaux montre que les spectres de sept espèces identifiées par μ EXAFS sont bien reconstruits (Figure V.7 a,b). La reconstruction du spectre de Zn-ferrihydrite n'est pas satisfaisante. Plus précisément, le spectre reconstruit de Zn-ferrihydrite présente un décalage important de phase par rapport au spectre de référence à la première, deuxième et troisième oscillation (Figure V.7 b). Ces résultats confirment l'absence de Zn-ferrihydrite dans les sols après phytoremédiation. D'autres types d'oxydes de fer de notre base de données ont été testés pour vérifier leur éventuelle présence. Les reconstructions de leurs spectres n'ont pas donné des résultats satisfaisants. Un exemple de la reconstruction du spectre de Zn-hématite est montré sur la figure V.7 b.

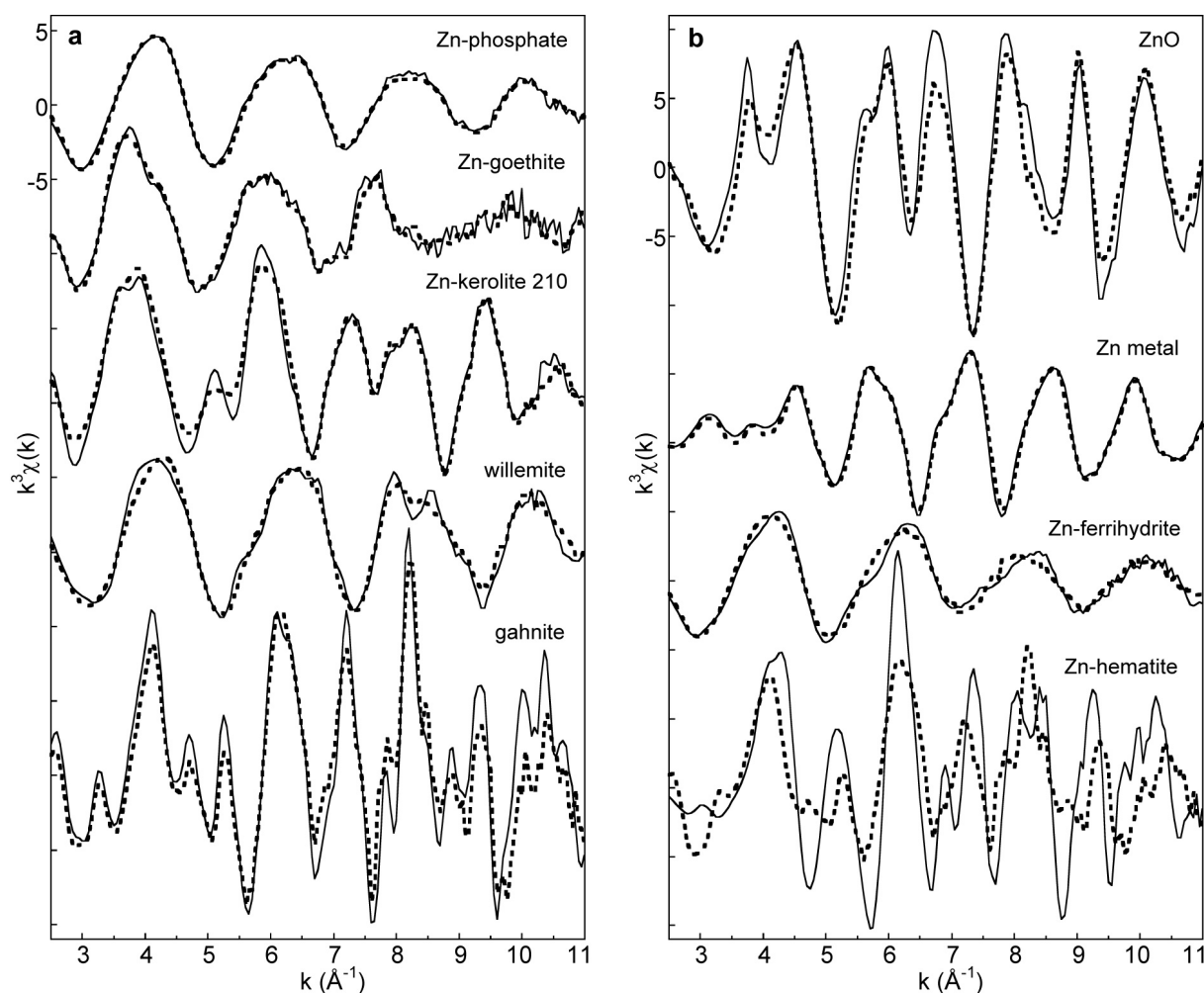


Figure V.7. Reconstruction par analyse en composantes principales des spectres des composés de référence à partir de 7 composantes principales extraites de l'ensemble des spectres μ EXAFS expérimentaux. Les spectres des composés de référence sont en trait plein, les spectres reconstruits sont en pointillé.

V.3. Spéciation quantitative du zinc

Les proportions relatives de chacune des espèces de Zn dans le volume de sol à l'échelle macroscopique ont été déterminées grâce à l'acquisition des spectres EXAFS sur poudres de sols de *Iris pseudacorus* (IP), *Phragmites australis* (PA) et *Salix viminalis* (SV) prélevés à la fin de la phytoremédiation dans le casier témoin (T) et dans le casier citrate (C). Les spectres de ces sols, dénommés en conséquence : IPT, PAT, SVT et IPC, PAC, SVC, ont été simulés par combinaison linéaire des espèces précédemment identifiées par μ EXAFS. Les simulations ont été effectuées sur la base de sept composantes, en incluant progressivement une, deux, trois composantes, etc.

Pour les six spectres, les meilleures simulations ont été obtenues par combinaison linéaire de trois espèces : Zn-phosphate (ZnPhos), Zn-kérolite (ZnKer) et Zn-goethite (ZnGoet) (Figure V.8). L'ajout d'une quatrième composante n'améliore pas les simulations. La somme des espèces est égale à 93 % dans chaque simulation. La précision sur les proportions des espèces est estimée à ± 10 % du zinc total. Ces résultats indiquent que dans les sols après phytoremédiation, Zn-phosphate, Zn-kérolite et Zn-goethite sont des espèces majoritaires et représentatives dans le volume de sol. Les quatre autres espèces, Zn métallique, ZnO, gahnite et willémitte, identifiées à l'échelle micrométrique, ne sont pas contenues en quantités significatives dans le volume de sol, plus précisément leurs quantités dans le sol sont inférieures à 10 % du zinc total.

La comparaison des spectres de six sols après phytoremédiation montre qu'ils sont globalement similaires en forme, phase et amplitude. Ceci indique que les six variantes de traitement (espèces végétales et traitements physico-chimiques) ont un effet similaire sur la spéciation du zinc. La spéciation résiduelle du zinc dans les sols après phytoremédiation est dominée par trois espèces : Zn-phosphate, Zn-kérolite et Zn-goethite. Des légères différences de détails entre les spectres sont dues aux variations des proportions de ces trois espèces.

Sans traitement au citrate, les sols contiennent 59-70 % de Zn-phosphate, 10-20 % de Zn-kérolite et 13-15 % de Zn-goethite. Avec la précision de ± 10 % du zinc total pour chaque espèce, les proportions des espèces dans les sols de trois plantes sont comparables et représentent en moyenne pour le casier témoin : 64 % de Zn-phosphate, 15 % de Zn-kérolite et 14 % de Zn-goethite.

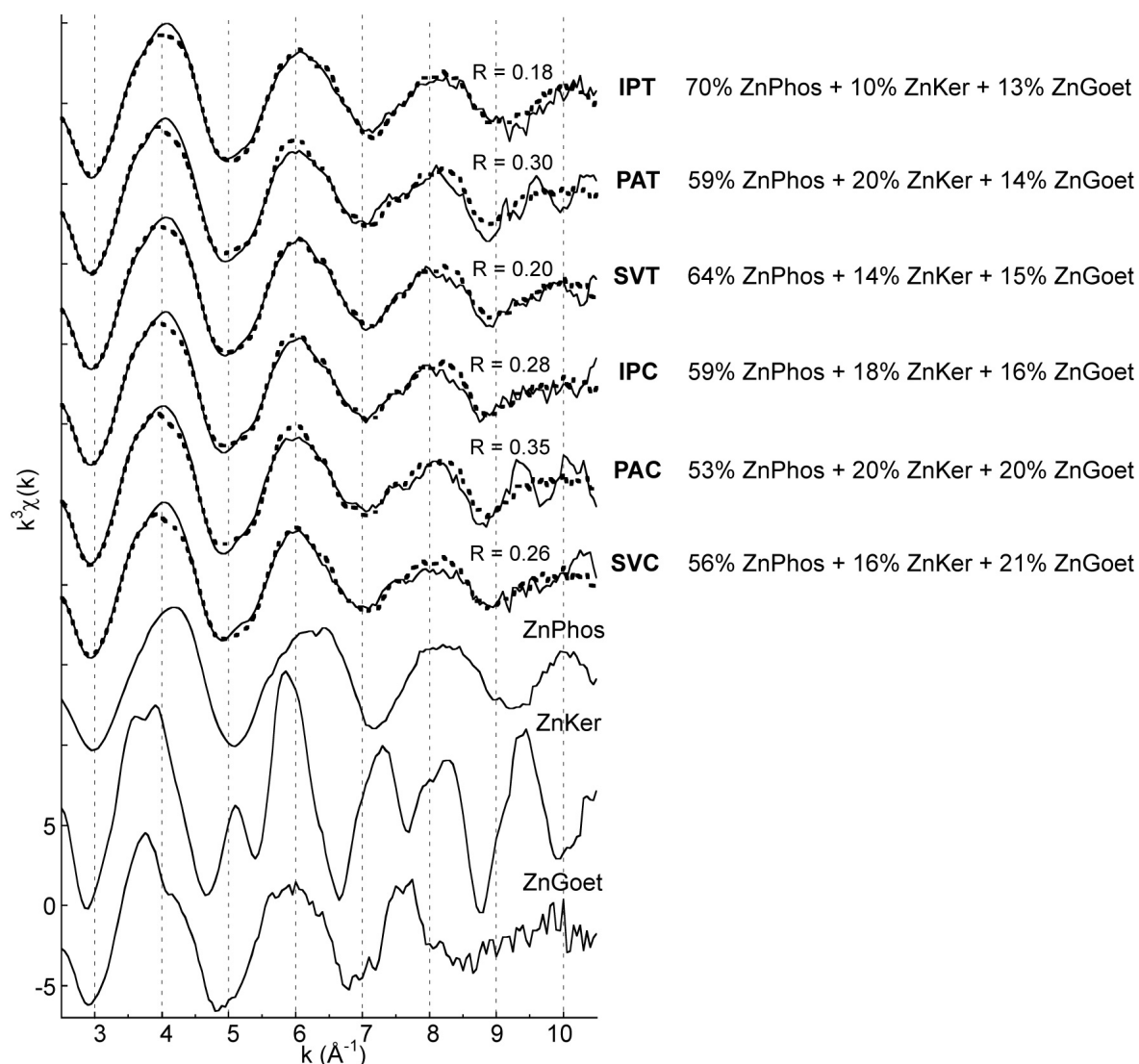


Figure V.8. Spectres EXAFS au seuil K de Zn des sols de *Iris pseudacorus*, *Phragmites australis* et *Salix viminalis* du casier témoin (IPT, PAT, SVT) et du casier citrate (IPC, PAC, SVC). Les spectres expérimentaux sont en trait plein, leurs simulations par combinaison linéaire de trois espèces : Zn-phosphate (ZnPhos), Zn-kérolite (ZnKer) et Zn-goethite (ZnGoet), sont en pointillé. La somme des espèces est égale à 93 % dans chaque simulation. La précision sur la proportion des espèces est estimée à ± 10 % du zinc total.

Avec traitement au citrate, les spectres de trois sols sont similaires entre eux et légèrement différents de ceux du casier témoin, ce qui indique que l'ajout du citrate produit un effet similaire sur la spéciation de Zn dans les trois sols. En moyenne pour les trois sols, la spéciation du zinc dans le casier citrate représente 56 % de Zn-phosphate, 18 % de Zn-kérolite et 19 % de Zn-goethite. La proportion de Zn-phosphate diminue de 8 % par rapport au témoin et les proportions de deux autres espèces, Zn-kérolite et Zn-goethite, augmentent de 3 et 5 %, respectivement. Ces variations des proportions sont visibles sur les spectres IPC, PAC, SVC comparés aux spectres IPT, PAT, SVT. Elles se traduisent par un décalage

de la première oscillation vers les petits k , l'apparition d'une bosse à la montée de la deuxième oscillation à 5.1 \AA^{-1} relative au signal de Zn-kérolite et une bosse plus prononcée à 7.5 \AA^{-1} relative au signal de Zn-goethite (Figure V.8). La diminution de la proportion de Zn-phosphate et l'augmentation des proportions de Zn-kérolite et de Zn-goethite dans le casier citrate par rapport au casier témoin ne sont pas dues à la redistribution de Zn entre ces pools. En effet, les proportions relatives de chaque espèce correspondent à des fractions molaires de chaque espèce par rapport à la quantité totale de Zn contenu dans chaque sol. Or, la somme de trois espèces dans les sols de chaque casier est la même et égale à 93 % selon les simulations, mais les quantités de Zn dans les deux casiers ne sont pas les mêmes. Le sol au niveau du système racinaire (sol rhizosphérique + sol non-rhizosphérique moyen) dans le casier citrate contient moins de Zn que le même type de sol du casier témoin, puisque 65 % du stock initial de Zn ont été lixiviés du sol dans le casier citrate et 50 % dans le casier témoin, en moyenne pour trois sols (cf. Tableau IV.4, Chapitre IV). Les proportions des espèces de Zn exprimées en concentrations molaires des espèces par rapport à la concentration molaire totale de Zn dans le sol de chaque casier peuvent être comparées, en tenant compte de la précision des simulations EXAFS ($\pm 10 \%$ de Zn) et de la précision des analyses chimiques ($\pm 5 \%$ de Zn). Ainsi, la proportion de 64 % de Zn-phosphate dans le casier témoin correspond à $10 \pm 5 \text{ mmol/kg}$ de Zn et la proportion de 56 % de Zn-phosphate dans le casier citrate correspond à $6 \pm 2 \text{ mmol/kg}$ de Zn (Figure V.10). Ces valeurs dans l'intervalle de la précision suggèrent que la quantité de Zn-phosphate dans le casier citrate pourrait être égale ou inférieure à celle dans le casier témoin. Les concentrations molaires de Zn-kérolite et de Zn-goethite dans le casier témoin ($2 \pm 2 \text{ mmol/kg}$ et $2 \pm 2 \text{ mmol/kg}$, respectivement) et dans le casier citrate ($2 \pm 2 \text{ mmol/kg}$ et $2 \pm 2 \text{ mmol/kg}$, respectivement) sont équivalentes, ce qui indique qu'avec traitement au citrate les pools de Zn-kérolite et de Zn-goethite restent constants. Les analyses chimiques ont montré cependant que plus de Zn a été extrait du casier citrate que du casier témoin. Les deux pools de Zn (Zn-kérolite et Zn-goethite), parmi les trois, étant constants, l'ensemble de ces résultats suggère que la différence en quantité de Zn extrait proviendrait vraisemblablement du pool Zn-phosphate. En effet, avec la précision des simulations EXAFS ($\pm 10 \%$) et la précision des analyses chimiques ($\pm 5 \%$), la diminution de $8 \pm 10 \%$ du pool Zn-phosphate dans le casier citrate correspond à la différence de $15 \pm 5 \%$ du zinc extrait dans le casier citrate par rapport au témoin. La quantité de Zn-phosphate diminue donc du fait de la dissolution et de la lixiviation d'une partie de ce pool suite à l'ajout du citrate. Cette hypothèse est confirmée par les pics de concentration de P et de Zn observés dans les lixiviats du casier citrate, ponctuellement suite à l'ajout du citrate ($[\text{PO}_4]_{\text{aq}} \sim 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Zn}]_{\text{aq}} \sim 10^{-5} \text{ M}$ dans le casier citrate vs. $[\text{PO}_4]_{\text{aq}} \sim 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Zn}]_{\text{aq}} \sim 10^{-6} \text{ M}$ dans le casier

témoin). Par ailleurs, notre étude de la solubilité de Zn avec l'ajout du citrate au sol sans plantes, dans les conditions du laboratoire, a montré que parmi les phases porteuses de zinc, Zn-phosphate se dissout préférentiellement aux autres phases avec l'ajout du citrate (cf. Chapitre III). Nous observons la même tendance dans les conditions du site pilote, en présence des plantes.

La figure V.9 compare le spectre du sol initial avant phytoremédiation avec les spectres des sols après phytoremédiation, ainsi que les proportions relatives des espèces de Zn dans ces sols. Cette comparaison révèle les changements de la spéciation moyenne du zinc dans le volume de sol, puisque chaque spectre représente la somme des spectres des espèces individuelles présentes dans le sol pondérée par la proportion de chacune des espèces. Avant phytoremédiation, la spéciation originelle du zinc dans le sol se caractérise par quatre espèces : Zn-ferrihydrite (30 %), Zn-phosphate (28 %), Zn-kérolite (24 %) et willémite (11 %). Après phytoremédiation, la spéciation résiduelle du zinc, en moyenne pour les trois sols du casier témoin et du casier citrate, se caractérise par deux espèces initialement présentes, Zn-phosphate (56-64 %) et Zn-kérolite (15-18 %), et une espèce néoformée, Zn-goethite (14-19 %). Les changements de la spéciation sont observables visuellement en comparant le spectre du sol initial avec les spectres des sols après phytoremédiation. La phytoremédiation induit un décalage de la première oscillation de 4.2 à 4.0 Å⁻¹ avec l'apparition d'une bosse à 3.7 Å⁻¹ relative au signal de Zn-goethite (flèches sur la figure V.9). Par ailleurs, la troisième oscillation, asymétrique dans le spectre du sol initial, devient plus symétrique dans les spectres des sols après phytoremédiation, avec l'apparition d'une bosse à 7.5 Å⁻¹ relative également à Zn-goethite (flèches sur la figure V.9).

Selon les résultats des simulations, la proportion relative de Zn-kérolite (ZnKer), phase initialement présente, passe de 24 % avant phytoremédiation à 15 % dans le casier témoin et à 18 % dans le casier citrate après phytoremédiation. Ces proportions correspondent aux concentrations molaires de 8 ± 5 mmol/kg, 2 ± 2 mmol/kg et 2 ± 2 mmol/kg, respectivement. Zn-kérolite a été identifiée dans les sols après phytoremédiation sans ambiguïté par μ EXAFS, ce qui signifie que la quantité de cette phase n'est pas égale à zéro, mais au moins à 2 mmol/kg. Cette quantité avoisine la quantité de Zn-kérolite dans le sol initial, en prenant en compte la limite basse de l'intervalle de la précision (3 mmol/kg). Avec la précision de la méthode, le pool Zn-kérolite peut être estimé approximativement constant. Le pool de la willémite (Willem) change de 11 % soit 4 ± 5 mmol/kg dans le sol initial à 0 % soit 0 ± 2 mmol/kg dans les sols après phytoremédiation (Figure V.10). Ceci étant, avec la précision de la méthode, le pool de la willémite peut être estimé constant et minoritaire, puisque, d'une part, la proportion relative de 11 % dans le sol initial avoisine l'incertitude et, d'autre part, la willémite a été identifiée sans ambiguïté dans les sols après phytoremédiation à l'échelle micrométrique par μ EXAFS.

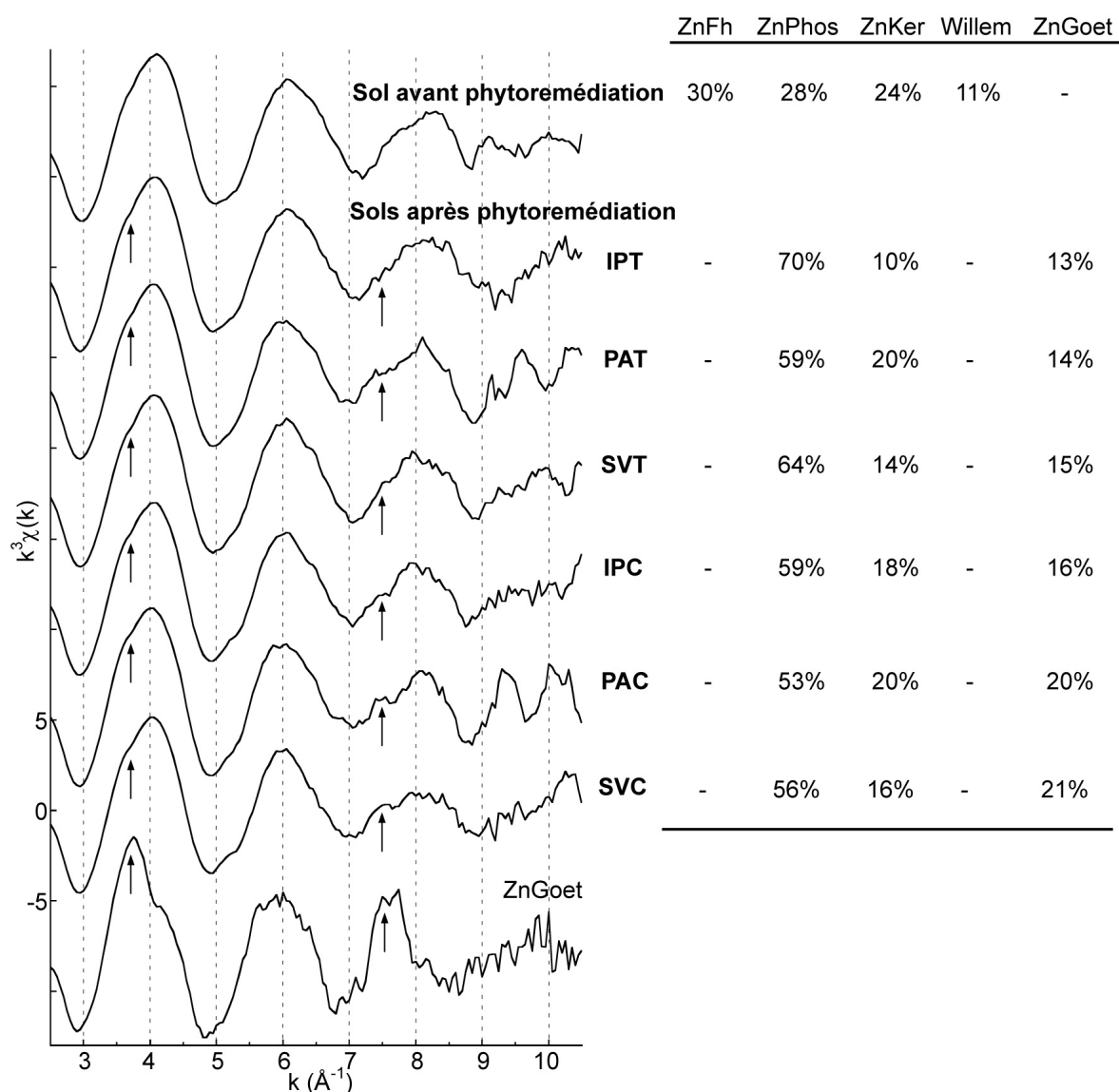


Figure V.9. Comparaison du spectre EXAFS au seuil K de Zn du sol initial avant phytoremédiation avec les spectres des sols de *Iris pseudacorus*, *Phragmites australis* et *Salix viminalis* après phytoremédiation dans le casier témoin (IPT, PAT, SVT) et dans le casier citrate (IPC, PAC, SVC). Les proportions des espèces, Zn-ferrihydrite (ZnFh), Zn-phosphate (ZnPhos), Zn-kérolite (ZnKer), willémité (Willem), Zn-goéthite (ZnGoet), dans chaque sol sont présentées dans le tableau. La somme des espèces est égale à 93 % dans chaque cas. La précision sur la proportion de chaque espèce est estimée à ± 10 % de Zn total dans chaque sol.

La proportion relative de Zn-phosphate (ZnPhos), pool initialement majoritaire, passe de 28 % dans le sol initial à 64 % dans le casier témoin et à 56 % dans le casier citrate, en moyenne pour les trois sols. Cette augmentation de la proportion relative de Zn-phosphate est mathématique, et due à la disparition d'un autre pool initialement majoritaire, Zn-ferrihydrite (30 % initial, 0 % restant). L'augmentation de la proportion de Zn-phosphate ne signifie pas l'augmentation physique du pool Zn-phosphate lors de la phytoremédiation. En

effet, exprimée en concentration molaire par rapport à la quantité de Zn dans chaque sol, la proportion de 28 % Zn-phosphate dans le sol initial correspond à 9 ± 5 mmol/kg de Zn et la proportion de 64 % Zn-phosphate dans le sol du casier témoin correspond à 10 ± 2 mmol/kg de Zn (Figure V.10). Avec la précision de la méthode, ces valeurs sont conservatives, ce qui indique que sans traitement au citrate le pool Zn-phosphate reste constant. En revanche, comme nous l'avons vu précédemment, avec l'ajout du citrate, une partie minoritaire du pool Zn-phosphate est dissoute et lixiviée.

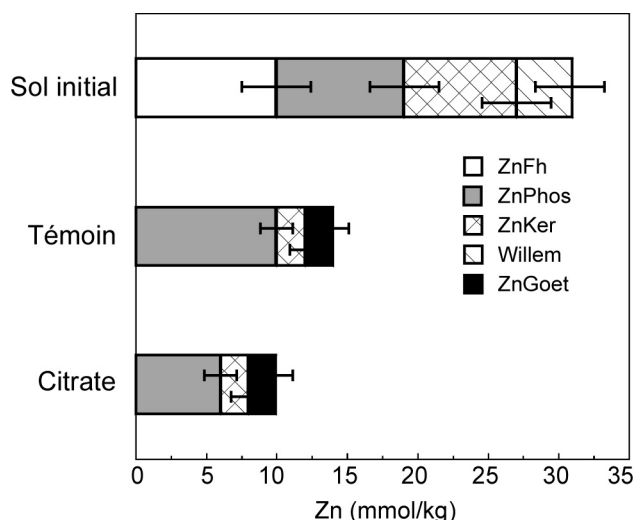


Figure V.10. Concentrations molaires des espèces de Zn dans le sol initial avant phytoremédiation et dans les sols après phytoremédiation (en moyenne pour les trois sols au niveau du système racinaire) du casier témoin et du casier citrate. Les concentrations molaires des espèces correspondent aux pourcentages de chaque espèce (déterminés par simulation des spectres EXAFS expérimentaux) multipliés par les concentrations molaires de Zn dans chaque sol (déterminées par analyse chimique). La somme des espèces dans chaque sol est égale à 93 % de Zn dans chaque sol selon les simulations. Les barres d'erreur prennent en compte l'incertitude des simulations EXAFS (± 10 %) et l'incertitude des analyses chimiques (± 5 %).

La proportion de Zn-ferrihydrite (ZnFh), espèce initialement majoritaire, passe de 30 % dans le sol initial à 0 % dans les sols après phytoremédiation. A la différence de la willémite, Zn-ferrihydrite n'a pas été identifiée par μ EXAFS dans les sols après phytoremédiation, et son absence a été confirmée par l'ACP. En même temps, une autre espèce d'oxyde de fer zincifère, Zn-goethite substituée (ZnGoet), s'est formée dans le sol à la hauteur de 14 % (casier témoin) à 19 % (casier citrate). En termes de concentrations molaires, 30 % de Zn-ferrihydrite dans le sol initial correspondent à 10 ± 5 mmol/kg de Zn, et 14-19 % de Zn-goethite dans les sols après phytoremédiation correspondent à 2 ± 2 mmol/kg de Zn (Figure V.10). L'ensemble de ces résultats indique que Zn-ferrihydrite a

été dissoute lors de la phytoremédiation, une quantité minoritaire de Zn libérée de ce pool a été coprécipitée avec Fe en Zn-goethite et une quantité majoritaire a été lixiviée. Selon les analyses chimiques, 50 % du stock initial de zinc ont été lixiviés du casier témoin et 65 % du casier citrate, en moyenne pour les trois sols au niveau du système racinaire (cf. Tableau IV.4, Chapitre IV). Avec la précision des analyses chimiques (± 5 %) et la précision des simulations EXAFS (± 10 %), la quantité du zinc lixivié du casier témoin (50 ± 5 %) correspond majoritairement au pool de Zn-ferrihydrite éliminé (30 ± 10 %). Comme nous l'avons vu précédemment, la différence de 15 ± 5 % du zinc lixivié du casier citrate par rapport au témoin correspond, dans l'intervalle de la précision, à l'élimination de 8 ± 10 % du pool Zn-phosphate suite à l'ajout du citrate.

V.4. Mécanismes de remobilisation/immobilisation du zinc

Les analyses de la spéciation du zinc dans le sol avant et après phytoremédiation ont mis en évidence que les mécanismes majeurs impliqués dans remobilisation/immobilisation du zinc lors de la phytoremédiation sur le site pilote sont la dissolution du pool de Zn-ferrihydrite, un oxyhydroxyde de fer zincifère initialement majoritaire, entraînant la mise en solution et la lixiviation de Zn et de Fe, et la coprécipitation de Zn et Fe en nouvelle forme d'oxyhydroxyde de fer zincifère, Zn-goethite. Les analyses de μ SXRF et de μ EXAFS ont montré également la présence des précipités de Zn-phosphate à l'interface sol-racine, ce qui suggère la formation de Zn-phosphate dans la rhizosphère. Dans une autre étude, Panfili et al. (2005) ont montré la formation de Zn-phosphate suite à la phytostabilisation avec des graminées *Agrostis tenuis* et *Festuca rubra* d'un sédiment de curage contaminé par Zn. Dans l'étude de Panfili et al. (2005), le sédiment à l'état initial était riche en P ($[P_2O_5] = 0.7$ %), mais ne contenait pas de Zn-phosphate. Lorsque le sédiment était mis en culture avec des plantes, la sphalérite (ZnS), l'espèce initialement majoritaire, a été oxydée et dissoute. La fraction de Zn exportée dans les lixiviats étant minime (0.2 % du stock initial de Zn), le zinc en solution libéré de ZnS s'est transformé dans le sol en Zn-phosphate par l'adsorption sur les phosphates présents et/ou par précipitation avec P en solution (Panfili et al., 2005). Dans notre cas, le sol est également riche en P ($[P_2O_5] = 0.8$ %), mais, à la différence de l'étude de Panfili et al. (2005), Zn-phosphate est un des pools de Zn initialement présents et majoritaires. Les analyses EXAFS dans le volume de sol avant et après phytoremédiation ont montré que quantitativement le pool Zn-phosphate reste constant après la phytoremédiation sans traitement au citrate. Ces résultats suggèrent que si la remobilisation de Zn-phosphate initial a eu lieu, cette phase reprécipite rapidement en

même quantité. A la différence de l'étude de Panfili et al. (2005), dans notre cas, le pool Zn-ferrihydrite est la source principale de Zn libéré en solution. Le zinc libéré de ce pool est rapidement transféré dans les lixiviats, grâce au dispositif de drainage des casiers, ce qui empêche probablement sa précipitation avec phosphate. Le phosphore étant un élément très peu soluble dans les sols (Hinsinger, 1998a), il est possible également que la concentration de P en solution est insuffisante pour la saturation par rapport à Zn-phosphate. Une migration importante de P en solution ($[\text{PO}_4]_{\text{aq}} \sim 10^{-4}$ M dans le casier citrate vs. $[\text{PO}_4]_{\text{aq}} \sim 10^{-6}$ M dans le casier témoin) n'a été observée que ponctuellement suite à l'ajout du citrate. Une partie minoritaire du pool Zn-phosphate a été dissoute et lixiviée avec traitement au citrate. Ainsi, la contribution du phosphate dans la transformation du zinc lors de la phytoremédiation apparaît minoritaire. Dans notre cas, ce sont des oxyhydroxydes de Fe qui sont impliqués majoritairement dans remobilisation/immobilisation de Zn.

Le sol à l'état initial est un sol agricole, labouré et oxygéné (Eh +300 mV, pH 7.0-7.5), relativement pauvre en fer ($[\text{Fe}_2\text{O}_3] = 2.6\%$ comparé à 3.6 % en moyenne dans les sols français (Baize, 2000)) et ne contenant pas de formes de Fe (II) (sulfures, carbonates) (Baize et al., 2002). En absence de formes réduites de Fe, le passage de Fe en solution est contrôlé par la réduction des formes oxydées (Takahashi et al., 2004). La forme oxydée de Fe dans le sol initial étant la ferrihydrite, sa transformation en goethite dans les conditions naturelles nécessite sa dissolution avec la libération de Fe (II), suivie d'une nucléation et croissance de la goethite en solution (Schwertmann and Murad, 1983). La réorganisation interne et la déshydratation de la ferrihydrite entraîne généralement la formation de l'hématite (Johnston and Lewis, 1983). Dans les conditions originelles du champ agricole, la transformation de la ferrihydrite en goethite a été probablement retardée du fait des conditions redox et pH, de la présence des ions inorganiques compétitifs (silicate, phosphate), et/ou d'une humidité relative insuffisante (Cornell and Schwertmann, 1996; Paige et al., 1997).

Dans les casiers du site pilote, le sol initial a été mis en culture avec des plantes de milieux humides, et soumis à l'irrigation avec l'alternance des périodes d'hydromorphie et d'assèchement. Les casiers du site pilote ont été inondés durant les périodes de forts arrosages et drainés et asséchés durant les périodes d'arrosages minimaux. Les valeurs du potentiel redox (Eh), mesurées dans les lixiviats à l'issue des casiers, varient de +200 à +300 mV durant les périodes d'assèchement, et descendent jusqu'à +100 à -250 mV durant les périodes d'hydromorphie, ce qui indique les fluctuations des conditions physico-chimiques globales dans les casiers entre les conditions oxydantes et réductrices au cours de la phytoremédiation (Figure V.11). Les fluctuations similaires des conditions redox sont souvent observées dans les marais en fonction des saisons (Bostick et al., 2001). Les micro-analyses de la spéciation ont montré par ailleurs une forte hétérogénéité des conditions

physico-chimiques locales dans le sol au niveau de la rhizosphère, à l'échelle de quelques dizaines de micromètres. Cette hétérogénéité des conditions dans les casiers, tant au niveau macroscopique qu'au niveau microscopique, témoigne manifestement d'une forte activité redox du milieu, qui résulte vraisemblablement de l'interaction de l'activité racinaire (respiration végétale et bactérienne, émission de l'oxygène, exsudation des composés organiques par les racines, etc.) avec les facteurs physico-chimiques du milieu dus à l'irrigation contrastée (inondation-anaérobie, drainage, assèchement-aérobie), produisant un effet synergique. En effet, l'adaptation vitale des racines de ces plantes de milieux humides aux changements des conditions hydromorphie-assèchement du milieu, et plus particulièrement la diffusion et l'émission de l'oxygène par les racines *via* les aérénchymes vers le sol dans les conditions d'hydromorphie, permet de créer un environnement biochimiquement actif où les conditions locales au niveau de la rhizosphère sont en contraste avec les conditions globales du milieu.

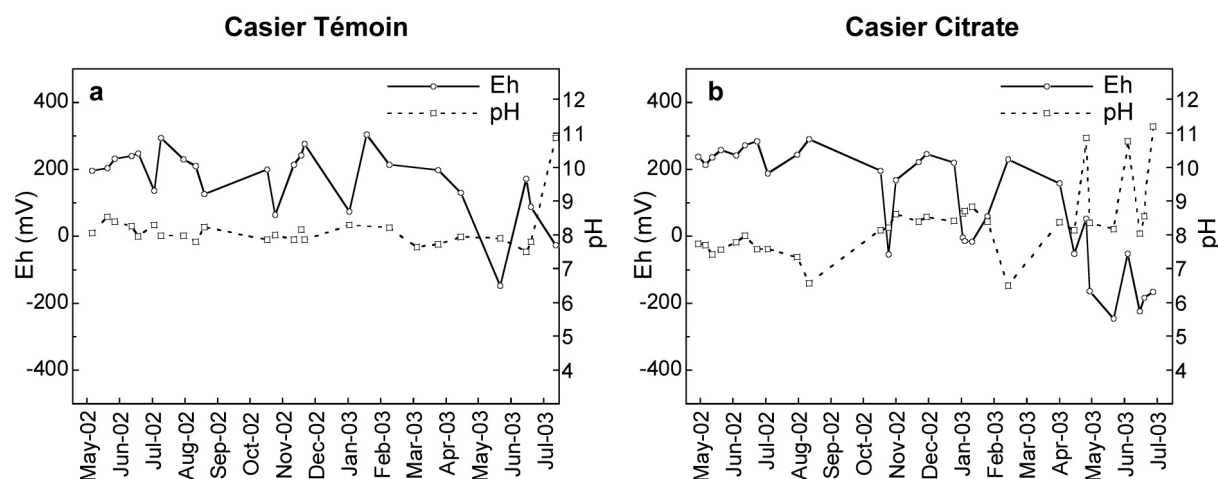


Figure V.11. Eh et pH mesurés dans les lixiviats issus du casier témoin (a) et du casier citrate (b).

Les fluctuations des conditions redox entraînent les fluctuations des concentrations des éléments dans les lixiviats. Les pics de migration simultanée de Fe ($[Fe]_{aq} \sim 10^{-5}$ M) et de Zn ($[Zn]_{aq} \sim 10^{-6}$ M) dans les lixiviats du casier témoin sont observés lors des périodes d'hydromorphie (en juillet 2002, novembre 2002, janvier 2003) indiquant la dissolution de Zn-ferrihydrite. Les valeurs de pH dans ces périodes restent autour 7.5-8.0, comme en moyenne tout le long de la période de phytoremédiation. Ces valeurs de pH dans les domaines de Eh $< +100$ mV correspondent au domaine de prédominance de Fe^{2+} , qui avoisine le domaine de stabilité de la goethite. Une légère fluctuation de pH et/ou du potentiel redox peut conduire à une précipitation de la goethite ou à la dissolution de cette phase. Une hausse de pH est susceptible d'entraîner la précipitation de la goethite même dans les périodes du bas

potentiel redox ($Eh < +100$ mV), une baisse de pH est susceptible d'entraîner sa dissolution rapide. A pH ~ 8 et $Eh > +100$ mV la goethite est thermodynamiquement stable (Collins and Buol, 1970; Faulkner and Richardson, 1989). Ainsi, les conditions physico-chimiques sur le site pilote sont favorables à la dissolution de la ferrihydrite et à la formation de la goethite. Les mesures de Eh et de pH sur le site pilote ont été effectuées ponctuellement à des interventions très espacées dans le temps. Ainsi, elles ne reflètent pas le cycle complet du fer. Il est possible que les fluctuations de pH et Eh provoquent la précipitation de la goethite et sa dissolution à plusieurs reprises. La stabilité de la goethite zincifère dépend aussi des concentrations de Fe et de Zn en solution. Or, Fe et Zn en solution, sous forme ionique ou de complexes en solution avec des ligands organiques exsudés dans la rhizosphère, migrent dans les lixiviats. La diminution de Fe et de Zn en solution (sous-saturation par rapport à la goethite) est susceptible de provoquer la dissolution de la goethite. La migration de Fe et de Zn dissous dans les lixiviats pourrait expliquer la transformation partielle de Zn-ferrihydrite en Zn-goethite.

Un phénomène similaire de solubilisation et de transformation des phases porteuses de Zn en fonction des périodes saisonnières d'assèchement-oxydation (pendant l'été) et d'hydromorphie-réduction (pendant l'hiver) a été observé dans un sédiment de curage contaminé, mis en dépôt sur un sol non contaminé (Isaure, 2002; Isaure et al., 2005). A la différence de notre étude, dans ce sédiment, les phases porteuses initiales et majoritaires sont des sulfures de Zn (ZnS). L'oxydation des sulfures suite à l'aération du sédiment, renforcée par le développement d'un couvert végétal sur le dépôt, entraîne la lixiviation et la migration de Zn du sédiment vers le sol. Une partie de Zn libéré en solution est piégée par les oxyhydroxydes de fer (sous forme de Zn-ferrihydrite) présents dans le sédiment, et dans le sol Zn est également piégé en partie par les oxyhydroxydes de fer. La réduction des oxyhydroxydes de fer, à leur tour, dans les conditions d'hydromorphie-réduction (pendant l'hiver) entraîne la solubilisation du zinc. La comparaison des résultats obtenus dans notre étude avec ceux de l'étude d'Isaure, montre qu'il existe une « cyclicité » de la solubilisation et de piégeage du zinc en fonction des fluctuations d'hydromorphie et d'assèchement, et que les mécanismes de remobilisation et d'immobilisation du zinc sont conditionnés par la nature des phases porteuses.

Dans notre cas, dans le système sol-plante, la transformation ferrihydrite-goethite pourrait également être catalysée par l'activité biologique dans la rhizosphère. En effet, la réduction de la ferrihydrite par les bactéries Fe(III)-réductrices a été observée (Straub and Schink, 2004). Par ailleurs, les bactéries Fe(II)-oxydantes ont été trouvées en association avec les oxydes de Fe dans les « plaques » formées sur les racines des macrophytes (Emerson et al., 1999), et des études mettent en avant le rôle important des microorganismes dans la formation des oxyhydroxydes de Fe (Emerson et al., 1999; St-Cyr

and Campbell, 2000; Weiss et al., 2003). Par ailleurs, des plaques de précipités racinaires d'oxyhydroxydes de Fe, similaires à celles des plantes de milieux humides, ont été observées également sur les racines des plantes terrestres n'ayant pas de capacité de diffuser de l'oxygène dans la rhizosphère, en particulier, *Agrostis tenuis* et *Festuca rubra*, cultivées sur un sédiment de curage mis en dépôt (Panfili, 2004). Ces résultats suggèrent que la diffusion de l'oxygène par les racines n'est pas une condition indispensable à la formation de plaques d'oxyhydroxydes, et que les mécanismes de défense biologique des racines et des microorganismes pourraient jouer un rôle important dans leur formation. Dans notre cas, les plaques formées à la surface des racines du phragmite et les précipités au voisinage des racines du phragmite et de l'iris contiennent de la goethite zincifère. Le piégeage du zinc dans ces précipités suggère que la formation de ces précipités pourrait être associée aux mécanismes biologiques de détoxification vis-à-vis de l'excès de Zn dissous et toxique. Ainsi, les précipités de Zn-goethite à l'interface sol-racine pourraient être également d'origine biologique.

Dans les milieux non-sulfurogènes, en conditions d'hydromorphie et d'anaérobie, les bactéries Fe(III)-réductrices réduisent enzymatiquement Fe (III) en Fe (II) en couplant cette réduction avec l'oxydation des composés organiques et/ou H₂ (Lovley, 1993). Lorsque Fe (II) est en contact avec des oxydants disponibles en fonction des conditions du milieu (O₂, NO₃⁻, Mn (IV), etc.), il se réoxyde en Fe (III). En présence de l'oxygène cette oxydation est très rapide, en absence ou déficience de l'oxygène, elle est catalysée par les bactéries Fe(II)-oxydantes (Emerson, 2000).

Dans la rhizosphère des plantes de milieux humides, la réduction biotique de Fe (III) et l'oxydation abiotique et/ou biotique de Fe (II) sont couplées par les bactéries Fe(III)-réductrices et Fe(II)-oxydantes, juxtaposées à l'échelle de quelques millimètres (Emerson et al., 1999). A la différence des plantes terrestres, les plantes de milieux humides émettent de l'oxygène par les racines dans les conditions du stress anoxique, en créant ainsi les zones microaérobies dans un milieu globalement sub- ou anoxique susceptible de contenir Fe (II) (Armstrong, 1979; Armstrong et al., 2002). La diffusion de O₂ dans cet environnement est limitée, et les gradients de diffusion de O₂ et de Fe (II) sont opposés. Dans les zones microaérobies l'oxydation abiotique de Fe (II) (par O₂) est en compétition avec l'oxydation biotique. En oxydant Fe (II), les bactéries Fe(II)-oxydantes produisent des oxydes de Fe (III) qui sont un excellent substrat pour les bactéries Fe(III)-réductrices. De cette façon, les bactéries parviennent à boucler le microcycle de Fe à des interfaces redox dans la rhizosphère (Sobolev and Roden, 2002).

L'existence des interfaces redox dans la rhizosphère est révélée, dans notre cas, également par la présence simultanée des grains de Zn métallique pur (Zn⁰), des grains de

Zn métallique oxydé contenant les mélanges $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et des grains de ZnO pur. Ces trois formes ont été identifiées sans ambiguïté par μEXAFS dans les rhizosphères de trois types de plantes, au voisinage immédiat des racines (de quelques μm à 2 mm). La présence du zinc réduit sous forme métallique dans une rhizosphère globalement oxygénée, comme l'atteste la présence de la goethite, l'absence de ZnS, et l'émission de l'oxygène par les racines de ces plantes de milieux humides, est *a priori* inattendue, mais pourtant avérée. A notre connaissance, aucune étude à ce jour n'a révélé l'existence du zinc métallique natif dans les conditions naturelles de l'environnement oxygéné. En effet, le zinc natif est très rare ; on doute même de son existence. Il n'a été trouvé que dans quelques cas particuliers, dans l'environnement réducteur de gisements de minerai de cuivre et d'argent, en quantités de trace, sous forme de micro- et nano-inclusions du métal pur, en association avec Cu natif comme le laiton naturel $\alpha(\text{Cu,Zn})$, et en association avec ZnO (Goncharova, 1959; Boyle, 1961; Bartikyan, 1966; Clarke and Sillitoe, 1970; Filimonova and Trubkin, 2008). Il est considéré d'ailleurs qu'il n'existe point dans la nature du zinc natif.

Dans notre cas, la présence simultanée des formes réduites et des formes oxydées de Zn métallique, avec différentes proportions de ZnO, et de cristallinité variable indique que, quelle que soit l'origine de ces espèces, les conditions thermodynamiques locales et les facteurs cinétiques dans la rhizosphère permettent leur coexistence. Ceci indique par ailleurs que les paramètres thermodynamiques et les facteurs cinétiques locaux varient fortement d'un point à l'autre. Ces observations suggèrent l'existence de forts gradients de l'activité redox dans la rhizosphère, qui contient à la fois de l'oxygène gazeux et/ou dissous (espèces oxydantes) et des substances bioorganiques, produites par les racines et les microorganismes associés (espèces réductrices).

Rappelons que les grains de Zn^0 , $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO n'ont pas été identifiés dans le sol initial avant phytoremédiation. Deux hypothèses alternatives peuvent alors être émises pour expliquer leur origine dans le sol après phytoremédiation : la pollution (origine anthropique) ou la formation (origine biogéogénique).

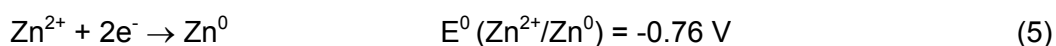
L'expérience de phytoremédiation a été menée sur un site pilote à ciel ouvert. Ainsi, les grains de Zn^0 , $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO pourraient *a priori* provenir des poussières d'émissions atmosphériques. L'hypothèse de la pollution ne peut pas être totalement exclue. Cependant, dans notre cas, la probabilité de la pollution atmosphérique est relativement faible, car, d'une part, le site pilote est situé dans une zone rurale, et d'autre part, pendant le transport du sol du site pollué de Pierrelaye vers le site pilote le sol a été protégé. Généralement, les poussières anthropiques, lorsqu'elles sont observées dans les sols et les sédiments, présentent des caractéristiques spécifiques de la source dont elles sont issues. Par exemple, les scories de ZnO provenant d'émission atmosphérique des fonderies de Zn ont été trouvées dans des friches industrielles et dans des sédiments de curage localisés aux

environs. Elles sont généralement bien cristallisées, de taille grossière (~500 μm), et sont accompagnées par des scories de ZnS de la même origine, puisque ZnO est le produit d'oxydation de ZnS dans les procédés métallurgiques (Thiry and Van Oort, 1999; Isaure et al., 2002). D'autres sources anthropiques comme, par exemple, le transport routier, la combustion, etc., peuvent générer des poussières fines (< 2.5 μm) de différente cristallinité.

Dans notre cas, les grains de Zn^0 , $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO sont de taille petite, de 5 à 20 μm . Comme le montrent les analyses μEXAFS , les deux grains de Zn métallique pur sont composés des particules bien cristallisées de taille micrométrique, un grain de ZnO pur est constitué des particules nanométriques, et six autres grains contiennent des mélanges $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$, et ils sont vraisemblablement de cristallinité moyenne variable. A première vue, la nature bien cristallisée des grains de Zn métallique pur témoigne plutôt en faveur de l'origine anthropique de ces grains. En effet, du point de vue cristallographique, si Zn métallique se formait lors de la phytoremédiation, au premier stade de la formation les particules devraient être nanocristallines. Cependant, une fois formées, les nanoparticules métalliques dans les conditions de la rhizosphère pourraient évoluer suivant les voies différentes, en fonction des conditions locales. Il est connu que selon la forme et la cinétique de formation des nanocristaux métalliques, leurs différentes facettes ont une stabilité différente en présence de l'oxygène. Dans la plupart des cas, les nanocristaux de Zn métallique s'oxydent rapidement et évoluent vers ZnO. Mais si la surface du nanocristal est quasi parfaite avec peu de défauts, une couche dense de ZnO se forme en empêchant l'oxydation complète du métal. C'est la voie de la formation des nanoparticules avec une structure « cœur-coquille » (anglais : core-shell) (Sun and Pan, 2004). Si la concentration locale de Zn en solution est élevée et l'oxygène est limité, *a priori* il n'y a pas de limitations pour que la croissance cristalline puisse continuer avec la formation des microcristaux. Le fait que dans notre cas les trois types d'espèces : Zn^0 , $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO coexistent à l'échelle de quelques dizaines de μm montre clairement une forte hétérogénéité des conditions locales dans la rhizosphère. La présence simultanée de ces trois espèces pourrait témoigner des différentes voies d'évolution de nanoparticules de Zn métallique formées dans la rhizosphère.

La possibilité de la formation de Zn métallique peut être évaluée du point de vue thermodynamique. Du fait du remplissage complet de ses couches électroniques ($3d^{10}4s^2$), le zinc ne possède qu'un degré d'oxydation (+2) et la forme métallique (0). De l'état d'oxydation (+2) le zinc ne peut être réduit qu'à l'état métallique (0). Le potentiel redox standard du couple $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^0$ est très électronégatif ($E^0(\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^0) = -0.76 \text{ V}$). Les conditions fortement réductrices sont donc nécessaires pour réduire le zinc. Si l'on prend en considération les paramètres physico-chimiques mesurés dans les lixiviats à l'issue des casiers du site pilote, la réduction de Zn(+2) en Zn(0) semble peu vraisemblable. En effet, les valeurs du potentiel redox (Eh) mesurées dans les lixiviats à l'issue des casiers se situent

dans l'intervalle de +300 mV à -250 mV (Figure V.11). Ces valeurs sont indicatives des conditions moyennes dans le volume du casier. Elles suggèrent que les conditions moyennes observées ne sont pas suffisamment réductrices pour permettre la réduction de Zn. Ceci étant, plusieurs limitations existent pour considérer quantitativement les paramètres (Eh, pH, concentration) dans les lixiviats dans une analyse thermodynamique de la réduction de Zn dans notre cas.



$$E = E^0 + (RT/2F) \ln a\text{Zn}^{2+} \quad (6)$$

En effet, les lixiviats sont des eaux de drainage des casiers contenant un volume important d'eau apportée par l'irrigation artificielle. Rappelons que durant toute la période d'expérience le volume de sol dans les casiers témoin et citrate a été inondé avec 1600 L d'eau, soit 100 mm en termes de quantité de précipitations, deux fois par mois. L'apport en eau mensuel pour un casier correspond alors à 3 fois la pluviométrie mensuelle moyenne dans la région du site pilote. Ainsi, les lixiviats sont des solutions très diluées par rapport à la solution du sol dans la rhizosphère. Le potentiel réel de réduction dépend de l'activité chimique $a\text{Zn}^{2+}$ dans le milieu, comme le montre la relation de Nernst pour la demi-réaction de réduction de Zn (6). L'activité chimique dépend fortement de la nature du solvant et du degré de solvatation de l'ion. L'activité $a\text{Zn}^{2+}$ dans les zones de dimension réduite dans la rhizosphère ne peut pas être estimée à partir des valeurs de concentrations ioniques et d'Eh mesurées dans les lixiviats. Les analyses μEXAFS montrent clairement une forte hétérogénéité des conditions locales dans la rhizosphère à l'échelle de quelques dizaines de μm . De plus, Zn métallique n'a pas été identifié par EXAFS sur poudre du sol total, ce qui indique que sa quantité dans le volume de sol est très limitée, et elle est inférieure à 10 % de Zn total. Ces résultats suggèrent que si le zinc métallique se forme pendant la phytoremédiation, cette formation se limite à certaines zones de volume extrêmement réduit (quelques centaines de μm^3) par rapport au volume total de sol dans le casier (5.4 m^3). Pour estimer les conditions réelles dans ces zones, il faut tenir compte des paramètres locaux (concentration, force ionique, nature et concentration des substances électro-actives, des substances ayant des propriétés catalytiques, etc.). Pour une mesure directe et précise des paramètres locaux (Eh, pH, etc.) dans les zones de transformation de Zn, il serait nécessaire d'utiliser des sondes de dimension comparable avec la dimension de la zone de transformation, c'est-à-dire d'une dimension au moins micrométrique. Les microélectrodes existantes à l'heure actuelle sont encore relativement limitées par leur fragilité et leur

sensibilité, et leur utilisation pour les mesures directes dans les conditions naturelles est limitée (Luster et al., 2008).

Si l'on part de l'hypothèse que le zinc métallique se forme, le fait que l'ensemble des grains Zn^0 , Zn^0 -ZnO et ZnO observés est localisé à l'interface sol-racine (de quelques μm à 2 mm de la surface des racines) et le fait que la réduction de Zn se produit dans une rhizosphère globalement oxygénée, laissent supposer que cette réduction serait forcément d'origine biologique. Cette réduction pourrait impliquer des substances biologiques produites par les plantes et/ou les microorganismes associés. Compte tenu de la composition biochimique de la rhizosphère (présence des membranes cellulaires des organismes vivants, des catalyseurs organiques et des précurseurs organométalliques tels qu'enzymes, peptides, etc.) plusieurs mécanismes de formation de Zn métallique pourraient être envisagés.

La réduction de Zn pourrait être directe *via* un mécanisme chimique, par interaction des agents organiques actifs donneurs des électrons (contenant les carbanions, par exemple) avec des complexes Zn(II)-organométalliques. Les carbanions sont des dérivés des composés organiques qui possèdent une paire électronique isolée, sur un ou plusieurs atomes de carbone (charge électrique négative C^-). De ce fait, les carbanions ont des fortes capacités réductrices (Carey and Sundberg, 2007). Un exemple démonstratif de la réduction directe de Zn *via* l'interaction de Zn(II) en solution avec la biomasse sèche de la luzerne, ou alfalfa (*Medicago sativa*), avec la formation de nanoparticules de Zn métallique a été montré récemment (Canizal et al., 2006). La méthode a été proposée pour la synthèse dans des conditions douces (à température ambiante et en solution) de nanoparticules de Zn métallique de forme, taille et cristallinité contrôlées. La biomasse d'alfalfa réduit également des éléments encore plus électronégatifs que Zn, en particulier Yb et Sm, qui forment les nanoparticules monométalliques, et Ti et Eu qui forment les nanoparticules bimétalliques Ti-Ni, Eu-Au (Tableau V.2) (Ascencio et al., 2003; Ascencio et al., 2004; Ascencio et al., 2005; Schabes-Retchkiman et al., 2006). Le mécanisme exact et les substances réductrices impliquées dans la bioréduction des éléments métalliques n'ont pas été identifiées, mais les auteurs suggèrent l'implication des tanins contenus dans la biomasse d'alfalfa. Les tanins sont des métabolites secondaires des végétaux supérieurs qui ont des propriétés antioxydantes et sont capables de précipiter les protéines. Ce sont des composés polyphénoliques de l'acide tannique et de ses dérivés comme acide gallique, acide ellagique, pyrogallol, etc. Les ligands phénoliques des tanins ont une forte affinité pour les métaux. En présence des métaux en solution les tanins précipitent avec la formation des complexes organométalliques hydrolysables (Haslam, 1989; Haslam, 1996; Khanbabaee and Van Ree, 2001). Les plantes utilisées dans notre étude sont des espèces de milieux humides naturellement très riches en tanins. En particulier, les racines de *Iris pseudacorus* et de *Salix*

viminalis sont des sources de quantités importantes de tanins comme cela indique leur usage pour la fabrication des pigments et pour le tannage (Lohmann, 1992). Ainsi, les tanins pourraient-ils être impliqués dans la formation des particules de Zn métallique dans notre cas.

Tableau V.2. Potentiels redox des éléments réductibles par la biomasse d'alfalfa.

Demi-réaction	E^0 , potentiel standard (V) ^a
$\text{Au}^{3+} + 3e^- = \text{Au(s)}$	1.52
$\text{Ag}^+ + e^- = \text{Ag(s)}$	0.80
$\text{Ni}^{2+} + 2e^- = \text{Ni(s)}$	-0.25
$\text{Zn}^{2+} + 2e^- = \text{Zn(s)}$	-0.76
$\text{TiO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2e^- = \text{Ti(s)} + \text{H}_2\text{O}$	-0.88
$\text{Ti}^{2+} + 2e^- = \text{Ti(s)}$	-1.63
$\text{Yb}^{3+} + e^- = \text{Yb}^{2+}$	-1.05
$\text{Yb}^{2+} + 2e^- = \text{Yb(s)}$	-2.80
$\text{Yb}^{3+} + 3e^- = \text{Yb(s)}$	-2.22
$\text{Sm}^{3+} + e^- = \text{Sm}^{2+}$	-1.55
$\text{Sm}^{2+} + 2e^- = \text{Sm(s)}$	-2.67
$\text{Sm}^{3+} + 3e^- = \text{Sm(s)}$	-2.30
$\text{Eu}^{3+} + e^- = \text{Eu}^{2+}$	-0.35
$\text{Eu}^{2+} + 2e^- = \text{Eu(s)}$	-2.80
$\text{Eu}^{3+} + 3e^- = \text{Eu(s)}$	-1.99

^a Potentiel standard de demi-réaction (Bard et al., 1985).

Un autre mécanisme de formation de Zn métallique pourrait également être envisagé. C'est la réduction indirecte, *via* un mécanisme enzymatique. En effet, le zinc est un oligo-élément, puisqu'il rentre dans la composition des enzymes. Cependant, à partir d'un certain seuil, le zinc devient toxique, et les plantes et les microorganismes adoptent des mécanismes de défense ou de détoxification intra ou extracellulaires et le transforment ainsi en formes moins toxiques (Alloway, 1995). Généralement, les mécanismes de détoxification des plantes et des microorganismes vis-à-vis des éléments métalliques consistent soit à former des composés insolubles (sulfures, phosphates, oxydes, etc.) soit à former du métal (Gaad and Griffiths, 1978; Lovley, 1993; Holmes et al., 1997; Labrenz et al., 2000; Hall, 2002; Mukherjee et al., 2002; Labrenz and Banfield, 2004; Moreau et al., 2004; Moreau et al., 2007) Les enzymes se lient sélectivement à des ions métalliques et provoquent des changements des comportements électrochimiques des métaux. Dans ce mécanisme de

réduction, les enzymes peuvent jouer à la fois le rôle de transporteurs des électrons et le rôle de réducteurs similaires aux réducteurs chimiques (Lovley, 1993).

En conclusion, cette discussion apporte des éléments de réponse et les scénarios possibles sur l'origine de Zn métallique et de ZnO dans la rhizosphère de ces plantes de milieux humides. La formation biologique de ces espèces dans la rhizosphère semble être possible. Des études plus approfondies sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Les techniques utilisées dans cette étude n'ont pas permis d'examiner avec précision la morphologie des grains de Zn^0 , $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO et leur association avec la matière biologique. Ces deux critères, en plus du critère de taille des particules, semblent être nécessaires pour pouvoir conclure sur l'origine biologique de ces espèces. L'étude des grains observés sur les lames minces par microscopie électronique apporterait plus d'information sur leur nature. Il serait également intéressant d'étudier les précipités racinaires sur les racines séparées du sol, en combinant microscopie électronique, μSXRF , μXRD et μEXAFS . La possibilité de la formation de Zn métallique par des biomolécules produites par les plantes et/ou les microorganismes pourrait être vérifiée, par exemple, par la mise en contact de la biomasse sèche des racines en poudre avec le zinc en solution. L'étude de la spéciation du zinc dans un échantillon contrôle du sol prélevé sur le terrain aux alentours du site pilote permettrait éventuellement de vérifier si les grains de Zn^0 , $\text{Zn}^0\text{-ZnO}$ et ZnO proviendraient de la pollution atmosphérique.

CHAPITRE VI. Evolution de la spéciation du cuivre suite à la phytoremédiation

*Ce chapitre présente l'étude de la spéciation du cuivre dans le sol avant et après phytoremédiation. Dans le sol initial, contrairement au zinc, qui est majoritairement sous formes de minéraux secondaires, le cuivre est associé essentiellement à la matière organique. A l'issue de la phytoremédiation, une partie du cuivre organique a été minéralisée avec la formation d'agrégats micrométriques constitués de nanoparticules du cuivre métallique, à l'interface sol-racine, en quantité importante. L'étude détaillée de l'interface sol-racines de *Phragmites australis* et de *Iris pseudacorus*, à l'échelle microscopique, par l'utilisation combinée de microscopie optique, μ SXRF, μ XRD et μ EXAFS en conjonction avec les calculs thermodynamiques, a permis de mettre en évidence que les particules du cuivre métallique sont d'origine biologique. Elles sont formées par les racines en association avec des champignons endomycorhizes. L'émission de l'oxygène par les biais des aérénchymes par les racines de ces plantes de milieux humides et l'exsudation des composés organiques favorisent l'oxydation et la dissolution de la matière organique porteuse de Cu et donc la libération de Cu (II) en solution. Le cuivre cationique étant très phytotoxique, ces plantes adoptent des mécanismes de détoxification vis-à-vis de l'excès du cuivre cationique toxique, et le transforment en cuivre métallique non-toxique. Ce nouveau mode de biominéralisation du cuivre par les racines peut être typique des plantes de milieux humides.*

Cette étude a fait l'objet d'un article intitulé « Formation of Metallic Copper Nanoparticles at the Soil - Root Interface », paru dans Environmental Science & Technology.

***Environmental Science & Technology* 2008, 42, 1766-1772**

Article :

Formation of Metallic Copper Nanoparticles at the Soil - Root Interface

paru dans *Environmental Science & Technology*

Alain Manceau¹, Kathryn L. Nagy², Matthew A. Marcus³, Martine Lanson¹, Nicolas Geoffroy¹,
Thierry Jacquet⁴ and Tatiana Kirpichtchikova^{1,4}

¹ LGIT-Maison des Géosciences, CNRS and Université J. Fourier, 38041 Grenoble Cedex 9,
France,

² Department of Earth and Environmental Sciences, 845 West Taylor Street, MC-186,
University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60607,

³ Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory, One Cyclotron Road,
Berkeley, California 94720,

⁴ Phytorestore-Site et Concept, Hôtel Vigée Le Brun, 8 rue du Sentier, 75002 Paris, France

Received August 13, 2007. Revised manuscript received November 16, 2007.

Accepted December 10, 2007.

ABSTRACT

Copper is an essential element in the cellular electron transport chain, but as a free ion it can catalyze production of damaging radicals. Thus, all life forms attempt to prevent copper toxicity. Plants diminish excess copper in two structural regions : rare hyperaccumulators bind cationic copper to organic ligands in subaerial tissues, whereas widespread metal tolerant plants segregate copper dominantly in roots by mechanisms thought to be analogous. Here we show using synchrotron microanalyses that common wetlands plants *Phragmites australis* and *Iris pseudoacorus* can transform copper into metallic nanoparticles in and near roots with evidence of assistance by endomycorrhizal fungi when grown in contaminated soil in the natural environment. Biomolecular responses to oxidative stress, similar to reactions used to abiotically synthesize Cu⁰ nanostructures of controlled size and shape, likely cause the transformation. This newly identified mode of copper biomineralization by plant roots under copper stress may be common in oxygenated environments.

Introduction

Copper is toxic to life at levels that vary depending on the organism. Humans are mandated to not exceed 1-2 mg/L copper in their drinking water (1, 2), while some freshwater animals and plants experience acute toxic effects at concentrations as low as 10 µg/L (3). Because the human food chain begins with plants, it is critical to understand how plants tolerate heavy metals including copper, which is frequently concentrated in soils as a result of pesticide application, sewage sludge deposition, mining, smelting, and industrial activities. This issue is also at the crux of applying phytoremediation approaches, which use green plants to decontaminate or contain polluted soils and sediments and to purify wastewaters and landfill leachates (4).

Metal-tolerant plants inhibit incorporation of excess metal into photosynthetic tissue by restricting transport across the root endodermis (stele) and by storage in the root cortex (5). In contrast, hyperaccumulating plants extract metals from soils and concentrate excess amounts in harvestable parts such as leaves. Copper detoxification seems to be linked to mechanisms that bind Cu to molecular thiol (SH) groups. Cysteine-rich peptides, such as phytochelatins which transport copper to the shoot, increase in response to high cellular levels of Cu (6, 7), and Cu-S binding occurs in roots and leaves of *Larrea tridentata* (Creosote bush) (8). However, an unidentified copper species, concentrated in electron-dense granules on cell walls and some vacuole membranes, appears to be the main

morphological form of copper sequestered in *Oryza sativa* (rice), *Cannabis sativa* (marijuana), *Allium sativum* (garlic), and *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch) (9-12).

Plants take in and exclude elements largely at the soil-root interface within the rhizosphere, i.e. the volume of soil influenced by roots, mycorrhizal fungi, and bacterial communities (13). Deciphering processes that control the bioavailability of metals in the field is difficult because the rhizosphere is compositionally and structurally complex. Here we report on using synchrotron-based microanalytical and imaging tools (14) to resolve processes by which metal-tolerant plants defend themselves against excess cationic copper. We have mapped the distribution of copper in self-standing thin sections of unperturbed soils using micro-X-ray fluorescence (μ -XRF) and identified structural forms of copper at points-of-interest (POIs) using micro-extended X-ray absorption fine structure (μ -EXAFS) spectroscopy and X-ray diffraction (μ -XRD). Because only a few small areas could be analyzed in reasonable times with microanalyses, the uniqueness of the microanalytical results was tested by recording the bulk EXAFS spectrum from a sample representing the entire rhizosphere and by simulating this spectrum by linear combination of copper species spectra from POIs.

We investigated copper speciation in rhizospheres of *Phragmites australis* (common reed) and *Iris pseudoacorus*, two widespread wetland species with high tolerances to heavy metals (15). *P. australis* frequently used to treat wastewaters (16) because it can store heavy metals as weakly soluble or insoluble forms. Its roots can be enriched in Cu 5-60 times relative to leaves, with large differences among ecotypes and between field-grown versus hydroponically grown plants (17, 18). To take into account natural complexity, including any influence of bacteria, fungi, or climate variation, our experiment was conducted outdoors, rather than in a greenhouse on seedlings using ex-solum pots or hydroponic growth methods. The soil was from the Pierrelaye plain, a 1200 ha truck-farming area about 30 km northwest of Paris, France. From 1899 to 1999, regular irrigation of the Pierrelaye plain with untreated sewage water from Paris caused contamination with heavy metals, mainly Zn, Pb, and Cu (19). Such pollution is pervasive worldwide because increasing populations and associated economic growth are diminishing available freshwater, thus leading to increased irrigation of farmlands with wastewaters.

Experimental Methods

Field Experiment. A detailed description of the phytoremediation experiment is given in Supporting Information.

X-ray Fluorescence. Elemental distributions in the initial soil and rhizospheric soils vegetated with *P. australis* and *I. pseudoacorus* were mapped by scanning several 30- μm -thick thin sections under a 10.0 keV (vegetated soil) or 13.05 keV (unvegetated soil) micro-X-ray beam while recording the X-ray fluorescence. The soil is rich in organic debris from past agricultural activity which causes it to be optically inhomogeneous over a few to several hundreds of micrometers. Therefore, both coarse and fine $\mu\text{-XRF}$ maps were recorded at resolutions from $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ to $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ using a beam dimension adjusted from $16 \text{ (H)} \times 10 \text{ (V)} \mu\text{m}^2$ to $5 \text{ (H)} \times 5 \text{ (V)} \mu\text{m}^2$ to match the step size. The counting time per pixel was 100 ms at 10.0 keV and 200 ms at 13.05 keV. The scanning speed was fast enough to prevent alteration of the initial Cu speciation by beam damage.

EXAFS Spectroscopy. In the $\mu\text{-EXAFS}$ measurement, the organically bound Cu species evolved over 30-45 min due to the instability of organic matter to intense X-ray radiation. Radiation damage was minimized by reducing scan times to 20 min per analyzed area and moving the sample by 15 μm along the direction of an organic particle to access fresh material for every scan. Caution was taken that all individual spectra averaged out before summing to improve statistics. For bulk EXAFS measurements, samples were frozen at 10 K. All spectra were recorded in fluorescence-yield detection mode, except those from the Cu grains ($\mu\text{-EXAFS}$), which were recorded in transmission mode.

X-ray Diffraction. Diffraction patterns were recorded in transmission mode with a Bruker 6000 CCD binned to 1024×1024 pixels.

Results and Interpretations

X-ray Fluorescence. In the initial soil, copper occurs in two morphological forms (Figure 1a). One form decorates coarse organic particles that have some recognizable structures from reticular tissue (insert in Figure 1a), and the other occurs in the fine clayey matrix in areas that show organic particulate shapes only at high $\mu\text{-XRF}$ resolution. In the two phytoremediated soils, similar Cu-organic particulate associations, but also, hot spots of Cu grains 5-20 μm in size were observed in the thin-section maps (Figure 1b-d). In the rhizosphere of *P. australis*, the Cu hot spots exist outside and in roots and specifically in cortical parenchyma, but not in central vascular cylinders from the stele that contain vascular bundles through which micronutrients are transported to reproductive and photosynthetic tissues. In contrast, the main roots and rhizome of *I. pseudoacorus* do not contain detectable Cu grains, but in the surrounding soil Cu grains are aligned, suggesting that they are associated with biological structures. Under an optical microscope filamentous and ramified organic structures, similar to root hairs or hyphae from endomycorrhizal fungi, are visible in

places where the Cu spots were observed by μ -XRF (Figure 1e, Supporting Information). Fungal forms are more likely because mycorrhizal hyphae typically are anastomosing, whereas root hairs are not. Fungi may also be implicated in the formation of Cu grains in the cortex of *P. australis* since roots of this plant are known to be colonized by arbuscular endomycorrhizae in contaminated environments (20). These hypotheses are consistent with the capacity of mycorrhizae to accumulate metals (21–23) and with the storage of Cu in secondary feeder roots of the water hyacinth *Eichhornia crassipes* (24). The Cu grains have about the same size as the electron-dense Cu granules ($\sim 2\ \mu\text{m}$) in cells of *E. splendens* placed in a CuSO_4 solution for 30 days (12).

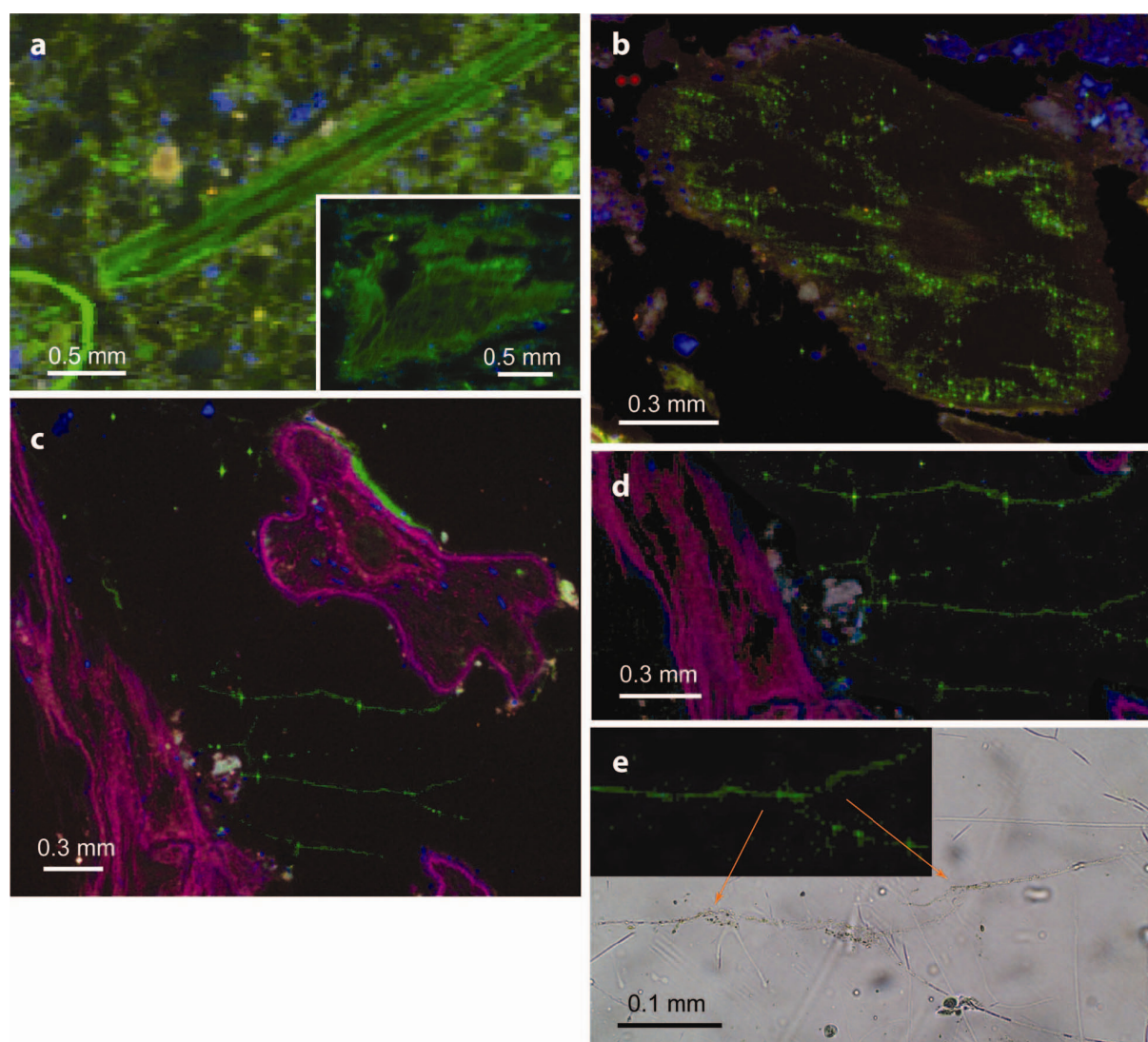


Figure 1. Micro-X-ray fluorescence (μ -XRF) maps showing the distribution of Zn (red), Cu (green), and Ca (blue) in the initial soil (a) and rhizospheres of *Phragmites australis* (b) and *Iris pseudacorus* (c-e). (a) Green features are organic matter (resolution = $20 \times 20\ \mu\text{m}^2$). The inset shows a reticular structure mapped at high resolution ($9 \times 9\ \mu\text{m}^2$). (b) Transversal section of a root with aggregates of Cu metal nanoparticles in the cortical region (resolution = $4 \times 4\ \mu\text{m}^2$). The central stele region contains

Zn but no Cu. (c) Although Zn occurs in the main roots of *I. pseudoacorus*, Cu is located in ramified organic filaments typical of mycorrhizal fungi and in a biofilm at the surface of the root (resolution = $8 \times 8 \mu\text{m}^2$). (d) Enlargement of the region rich in organic filaments showing two anastomosed hyphae. (e) Optical micrograph of one anastomosed hyphae from panel d with fluorescence map in inset. Data collected on beamline 10.3.2 of the Advanced Light Source (ALS) at Lawrence Berkeley National Laboratory (62).

EXAFS Spectroscopy. Organic Cu. While biological activity clearly modified the original distribution of Cu in the rhizospheres, the Cu species could not be identified from the μ -XRF maps but instead were elucidated using EXAFS spectroscopy. All eight μ -EXAFS spectra from areas in the original soil containing the particle morphologies and chemical compositions observed with μ -XRF can be superimposed on the soil's bulk EXAFS spectrum (Figure 2a), indicating that the initial Cu speciation occurred uniformly. If the initial soil contained various assemblages of Cu species that were distributed unevenly, then we might expect that the proportions of species also would have varied among analyzed areas and been detectable by μ -EXAFS spectroscopy (25); however, this was not observed. These spectra match those for Cu^{2+} binding to carboxyl ligands in natural organic matter, as commonly observed (Supporting Information).

Elemental Cu. In contrast, only the reference spectrum of elemental copper (Cu^0) matches the μ -EXAFS spectra of the 12 hot-spot Cu grains, which are statistically invariant (Figure 2b, Supporting Information). Photoreduction of Cu^0 in the X-ray beam cannot explain the formation of Cu^0 because (i) no elemental Cu was detected in the initial soil by powder and μ -EXAFS, and (ii) Cu^0 was detected in the two phytoremediated soils at 10 K by bulk EXAFS, and all individual spectral scans from the same sample could be superimposed. At 10 K, radiation damage is delayed (14), and if Cu had been reduced in the beam, the proportion of Cu^0 would have increased from scan to scan which was not observed.

Spectra for rhizosphere Cu grains and reference metallic copper have the same phase and overall line shape, but they have significant differences in fine structure and amplitude, which provide details about the nature of the Cu grains. In the soil Cu grains, shoulders at 5.8 and 7.3 \AA^{-1} are weak and the spectral amplitude is reduced by about 35 % and attenuated, relative to metallic copper. The decreased amplitude of the EXAFS signal for the Cu grains relative to well-crystallized metallic copper cannot arise from overabsorption (14) because the spectra of the grains were recorded in transmission mode and because the amplitude reduction from overabsorption would be uniform in R -space, as demonstrated for ZnS and MnO_2 particles (26, 27), which does not occur in this case.

Derived radial structure-functions share the four-peak character of Cu metal (28) (Figure 2c). However, long-distance pair correlations (i.e., the high-frequency components in

k space) are progressively diminished in the soil spectra, indicating multiple interatomic distances (structural disorder), reduced coordination numbers (CNs) from small particles (size effect), and/or abundant microstructural defects, such as grain and twin boundary dislocations or atomic-scale vacancies.

Simulation of the data using multiple-scattering *ab initio* FEFF calculations showed no evidence for structural disorder (Supporting Information). Good agreement between calculated and observed spectra was obtained with a first nearest neighbor shell (1NN) of 7.8 Cu atoms at 2.55 Å, a second shell (2NN) of 2.7 Cu at 3.61 Å, a third shell (3NN) of 9.2 Cu at 4.43 Å, and a fourth shell (4NN) of 3.9 Cu at 5.11 Å, compared to 1NN of 12 at 2.55 Å, 2NN of 6 at 3.61 Å, 3NN of 24 at 4.43 Å, and 4NN of 12 at 5.11 Å, in crystalline Cu metal. The mean-square displacement of bond length parameter (σ^2), a measure of disorder, converged in the simulated spectra to the same value as in the Cu metal reference (0.01 Å²) showing that Cu-Cu bonds vary in length by the same amount in the soil grains and reference.

Although the rhizosphere Cu grains are not structurally disordered, their CNs are only 65% (1NN), 45% (2NN), 38% (3NN), and 32% (4NN) of those in the Cu metal spectrum, indicating that structural order is limited in extent. The lower CN values are consistent with small particles having incompletely coordinated surface atoms. If closed-shell packed and monodispersed, these particles would have a minimum size of 10-15 Å assuming a spherical cuboctahedron shape and 15-20 Å assuming a hemispherical shape, as reported for nanoscale platinum particles (29). If Cu atoms were missing (e.g., atomic vacancies), as reported for Fe metal powders with a first-shell CN reduced by up to 50% of that in metallic Fe, the effective particle size could be as high as ca. 100 Å in diameter (30). A defective nanoparticle model is appealing because the surface area-to-volume ratio increases with only a lattice-vacancy parameter.

Constitutive nanoparticles in the micrometer-sized Cu grains are joined at particle or so-called grain boundaries, which might contain stabilizing organic molecules. Complexation of Cu to sulfur ligands in the interparticle or surficial regions is unlikely because a low-*R* Fourier component from Cu-S pairs at 2.2-2.3 Å was not observed on the radial structure-function (8). Also, the first Cu-Cu distance of 2.56 Å in the Cu nanoparticle is shorter than the distance of 2.70-2.90 Å reported for Cu-thiolate clusters (8, 31) and matches only that in elemental copper. In addition, organic S or P was not observed in the Cu grains using scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray fluorescence (SEM-EDX) in agreement with observations on electron-dense Cu granules in plants using electron energy loss spectroscopy (EELS) and EDX (10, 12). Complexation to oxygen ligands is possible because EXAFS has relatively low sensitivity to low-Z atoms. However, linear combinations of experimental spectra for organically bound Cu²⁺ and nanometallic Cu show that the

fraction of potential organic Cu in the Cu grains is less than 15%, if present at all (Supporting Information).

Amounts of Organic and Elemental Cu in the Rhizospheres. Composite bulk EXAFS spectra of the two remediated soils and spectra from the two species identified by μ -EXAFS (Figure 2d) intersect at the same k values, confirming that only two main Cu species exist in both rhizospheres. Fractional amounts of organically bound Cu from the original soil and metallic Cu formed during phytoremediation were estimated by reconstructing the bulk spectra with linear combinations of the two single species spectra. The best fit for the rhizosphere of *P. australis* was obtained with $75 \pm 10\%$ organic-bound Cu^{2+} and $25 \pm 10\%$ Cu^0 . The rhizosphere of *I. pseudoacorus* contains slightly less Cu^0 ($20 \pm 10\%$).

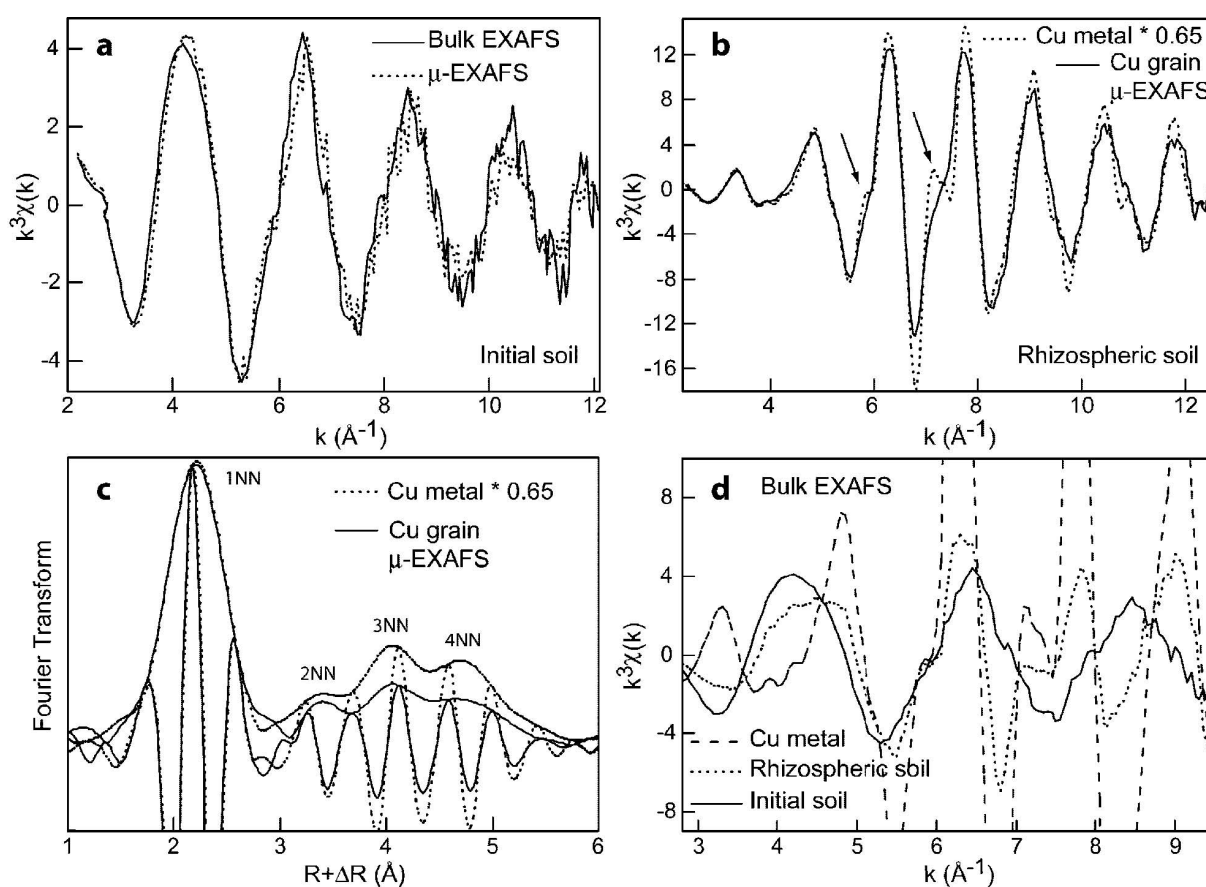


Figure 2. EXAFS data. (a) Representative Cu K-edge μ -EXAFS spectrum at room temperature of organic debris (dotted line) from the map in Figure 1a and the bulk EXAFS spectrum at 10 K of the initial soil (solid line). (b) Representative μ -EXAFS spectrum of Cu grains from *P. australis* rhizosphere (solid line) and bulk EXAFS spectrum of reference Cu metal at room temperature. The amplitude of the reference spectrum was multiplied by 0.65. (c) Fourier transform (modulus plus imaginary part) of the EXAFS spectra in panel b. The amplitude of the reference's first shell peak (1NN contribution) was scaled to that of the sample by multiplying the reference EXAFS signal by 0.65. (d) Bulk EXAFS spectra of the initial soil (10 K, solid line), *P. australis* rhizosphere (10 K, dotted line), and Cu metal

(room temperature, dashed line). The spectrum for the *I. pseudoacorus* rhizosphere is similar to that of *P. australis* and was omitted for clarity. The μ -EXAFS data were recorded on beamline 10.3.2 at the ALS and the bulk EXAFS data on the FAME beamline (BM 30B) at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, France) (63).

X-ray Diffraction. Featureless two-dimensional μ -XRD patterns from eight Cu hot spots confirm that the Cu grains are aggregates of nanoparticles. However, three patterns display a faint continuous diffraction ring at the Bragg angle for the brightest 111 reflection of Cu metal, indicating larger individual particles with a domain size of 130-150 Å (Figure 3). About 25×10^4 larger particles would be needed to produce these XRD patterns, but they would comprise only about 0.01% of the analyzed volume (Supporting Information). Thus, the diffracting Cu hot spots may have sufficient big particles to yield a powder ring, but they are not enough for their 2NN, 3NN, and higher Cu-Cu shells to contribute significantly to the EXAFS signal. Also, the big particles are undetected by μ -EXAFS because EXAFS signal intensity is linearly proportional to the number of atoms whereas XRD intensity is proportional to the number of atoms squared.

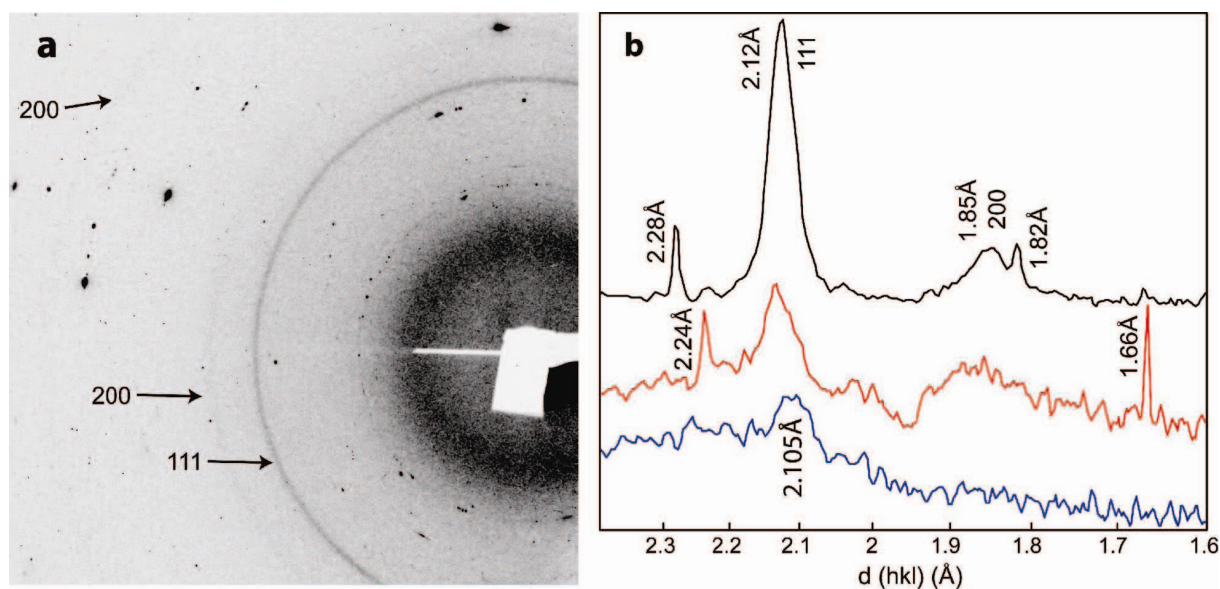


Figure 3. XRD data. (a) Two-dimensional μ -XRD pattern of a Cu grain showing the 111, 200, and 220 reflections of Cu metal. The spotty reflections are from coarse quartz grains ($d = 2.28, 2.24, 1.82, 1.66$ Å), and were used as internal calibration standards. (b) One-dimensional patterns obtained by summing intensities radially at constant Bragg angle. The pattern in black is from the Cu grain whose 2D pattern is shown in panel a. The two other patterns are from different grains. Their 111 reflections are too faint to be viewed on the 2D image, and they can be observed only after integration. The $d(111)$ and $d(200)$ spacings are shifted by +0.015 to +0.04 Å relative to pure Cu^0 ($d(111) = 2.09$ Å and $d(200) = 1.81$ Å), due probably to the incorporation of trace elements (e.g., Sn, W, Zn), as commonly

observed in metallic copper. Recording conditions: energy = 17 keV, beam size = 16 (H) × 7 (V) μm^2 , exposure time = 120 s.

Discussion

Mechanism of Cu^{2+} to Cu^0 Reduction. The rhizospheres were oxidizing as indicated by the presence of iron oxyhydroxide (goethite), absence of sulfide minerals, and the fact that *P. australis* and *I. pseudoacorus* are typical wetlands plants with aerenchyma that facilitate oxygen flow from leaves to roots (32). Thermodynamic calculations using compositions of soil solutions collected below the rhizosphere indicate that Cu^+ and Cu^{2+} species should have been dominant (Supporting Information). These points along with the occurrences of nanocrystalline Cu^0 in plant cortical cells and as stringer morphologies outside the roots together suggest that copper was reduced biotically. Ecosystem ecology of the rhizosphere indicates synergistic or multiple reactions by three types of organisms: plants, endomycorrhizal fungi, and bacteria.

Normally, organisms maintain copper homeostasis through cation binding to bioactive molecules such as proteins and peptides. When bound, the $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ redox couple has elevated half-cell potentials (33) that facilitate reactions in the electron-transport chain. Even though average healthy cell environments are sufficiently reducing (34), there are enough binding sites (35) to maintain copper in its two oxidized states. Copper is also important in controlling cell-damaging free radicals produced at the end of the electron-transport chain, for example in the superoxide dismutase enzyme Cu-Zn-SOD, which accelerates the disproportionation of superoxide to O_2 and hydrogen peroxide. However, unbound copper ions can catalyze the decomposition of hydrogen peroxide to water and more free radical species. To combat toxic copper and free radicals, many organisms overproduce enzymes such as catalase, chelates such as glutathione, and antioxidants (36). Mineralization could also be a defense against toxic copper, but reports of Cu^+ and Cu^{2+} biominerals are rare; only copper sulfide in yeast (37) and copper oxalate in lichens (38) and fungi (23) are known. Atacamite ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) in worms (39) does not appear to result from a biochemical defense.

Biomineralization of copper metal may have occurred by a mechanism analogous to processes for metallic nanoparticle synthesis that exploit ligand properties of organic molecules. In these processes, organic molecules are used as templates to control the shape and size of metallic nanoparticles (40, 41) formed by adding strong reductants to bound cations. For copper nanoparticles and nanowires, a milder reductant - ascorbic acid - has been used. Ascorbic acid, a well-known antioxidant, reduces Cu cations to Cu^0 only when the cations are bound to organic substrates such as DNA in the presence of oxygen in

the dark (42) or via autocatalysis on Cu metal seeds in the absence of stabilizing organic ligands (43). As an example of synthetic control, pH-dependent conformation of histidine-rich peptides has led to larger nanocrystals of Cu⁰ at pH 7-10 than at pH 4-6 (44).

Plants produce ascorbic acid for many functions (45) and rhizospheres often contain the breakdown products of ascorbic acid, which facilitates electron transfer during mineral weathering (46). Plants produce more ascorbic acid when grown in soils contaminated with heavy metals including copper (47). Fungi, which proliferate over plants (48) and bacteria (23) in metal-contaminated soils, can stabilize excess copper (49) by extracellular cation binding or oxalate precipitation (23), but mechanisms probably also require enzymes, thiol-rich proteins and peptides, and antioxidants (23, 48, 50). The formation of electron-dense Cu granules within hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from Cu- and As-contaminated soil (51) suggests that fungi also can produce nanoparticulate copper.

Some copper reduction possibly occurred in response to the European heat wave of the summer of 2003 (Supporting Information). Elevated expression of heat shock protein HSP90 and metallothionein genes has been observed in hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus in the presence of 2×10^{-5} M CuSO₄ in the laboratory (52). This suggests that a single driving force can trigger a biological defense mechanism that has multiple purposes. Thus, reduction of toxic cations to native elements may increase as rhizosphere biota fight metal stress and stresses imposed by elevated temperatures expected from global warming.

Reduction of Other Metal Cations to Their Metallic Forms. Laboratory evidence has shown that plants (53–55), fungi (23, 56, 57), bacteria (58), and algae (59) can transform other more easily reducible metals, including Au, Ag, Se (as H₂SeO₃), Hg, and Te, to their elemental states both intra and extracellularly. When mechanisms have been proposed, they typically have involved enzymes; however, ascorbic acid was implicated when Hg²⁺ was transformed to Hg⁰(g) in barley leaves (60). Theoretically all of these metal cations could be transformed by a reducing agent weaker than ascorbic acid (Table S1 in Supporting Information). However, binding appears to stabilize cationic forms in the absence of a sufficiently strong reductant such as ascorbic acid. Processes used in materials synthesis that were developed with biochemical knowledge might yield clues to other possible, but presently unknown, biologically mediated reactions in different organisms.

Natural Occurrence of Cu⁰ and Environmental Implications. The discovery of nanoparticulate copper metal in phytoremediated soil may shed light on the occurrence of copper in peats. Native copper likely forms abiotically in the reducing acidic environments of Cu-rich peat bogs (61). However, swamps by definition are more oxidizing with neutral to

alkaline pHs, and they may be ideal sites for biotic formation of metallic Cu nanoparticles. For example, in swamp peats near Sackville, New Brunswick, Canada, copper species unidentifiable by XRD were dissolved only with corrosive perchloric acid (61), suggesting they may have been nanoparticulate metal formed by active root systems of swamp plants. If swamp peats evolve to bog peats the Cu reduction mechanism could convert to autocatalysis on the initial nanocrystals (43). The addition of peats that either act as templating substrates or contain nanoparticulate copper could enhance the effectiveness of using wetlands plants for phytoremediation. In contrast to harvesting hyperaccumulators, the oxygenated rhizosphere would become an economic source of biorecycled copper, and rhizosphere containment would prevent copper from entering the food chain via herbivores, limiting potential risks to humans.

Acknowledgments

The authors thank J. L. Hazemann (ESRF), O. Proux (ESRF), and S. Fakra (ALS) for assistance during EXAFS measurements and the ESRF and ALS for the provision of beamtime. The ALS is supported by the Director, Office of Energy Research, Office of Basic Energy Sciences, Materials Sciences Division of the U.S. Department of Energy, under Contract No. DE-AC02-05CH11231. Support was provided to A. Manceau from the ANR-ECCO program and to K. L. Nagy from U.S. National Science Foundation grant EAR-0447310.

Supporting Information Available

Additional information on the field site, and data interpretations, including thermodynamic calculations of Cu speciation in the soil solution. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Literature Cited

- (1) OJEC. On the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Communities* **1998**, L-330 (5 December 1998).
- (2) EPA National primary drinking water standards. EPA Agency, **2003**, EPA-816-F-03-016.

- (3) EPA Aquatic life ambient freshwater quality criteria - copper **2007** revision. EPA Agency, EPA-822-F07-001.
- (4) Vassilev, A.; Schwitzguébel, J. P.; Thewys, T.; Van der Lelie, D.; Vangronsveld, J. The use of plants for remediation of metal contaminated soils. *Sci. World J.* **2004**, *4*, 9–34.
- (5) MacFarlane, G. R.; Burchett, M. D. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat. Bot.* **2000**, *68*, 45–59.
- (6) Van Hoof, N. A. L. M.; Hassinen, V. H.; Hakvoort, H. W. J.; Ballintijn, K. F.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C.; Ernst, W. H. O.; Karenlampi, S. O.; Tervahauta, A. I. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 1519–1526.
- (7) Clemens, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **2001**, *212*, 475–486.
- (8) Polette, L. A.; Gardea-Torresdey, J. L.; Chianelli, R. R.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Arenas, J. XAS and microscopy studies of the uptake and bio-transformation of copper in *Larrea tridentate* (creosote bush). *Microchem. J.* **1998**, *65*, 227–236.
- (9) Lidon, F. C.; Henriques, F. S. Subcellular localization of copper and partial isolation of copper proteins in roots from rice plants exposed to excess copper. *Aust. J. Plant Physiol.* **1994**, *21*, 427–436.
- (10) Arru, L.; Rognoni, S.; Baroncini, M.; Bonatti, P. M.; Perata, P. Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper rich solution. *Euphytica* **2004**, *140*, 33–38.
- (11) Liu, D.; Kottke, I. Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Biores. Technol.* **2004**, *94*, 153–158.
- (12) Ni, C. Y.; Chen, Y. X.; Lin, Q.; Tian, G. M. Subcellular localization of copper in tolerant and non-tolerant plant. *J. Environ. Sci. China* **2005**, *17*, 452–456.
- (13) Hinsinger, P.; Gobran, G. R.; Gregory, P. J.; Wenzel, W. W. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* **2005**, *168*, 293–303.
- (14) Manceau, A.; Marcus, M. A.; Tamura, N. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science*; Fenter, P. A., Rivers, M. L., Sturchio, N. C., Sutton, S. R., Eds.; Mineral. Soc. Amer.: Washington, DC, **2002**; Vol. 49, pp 341–428.

- (15) Weis, J. S.; Weis, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: Implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Intern.* **2004**, *30*, 685–700.
- (16) Peverly, J. H.; Surface, J. M.; Wang, T. Growth and trace metal absorption by *Phragmites australis* in wetlands constructed for landfill leachate treatment. *Ecol. Eng.* **1995**, *5*, 21–35.
- (17) Stoltz, E.; Greger, M. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* **2002**, *47*, 271–280.
- (18) Deng, H.; Ye, Z. H.; Wong, M. H. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environ. Pollut.* **2004**, *132*, 29–40.
- (19) Kirpichtchikova, T.; Manceau, A.; Spadini, L.; Panfili, F.; Marcus, M. A.; Jacquet, T. Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2006**, *70*, 2163–2190.
- (20) Oliveira, R. S.; Dodd, J. C.; Castro, P. M. L. The mycorrhizal status of *Phragmites australis* in several polluted soils and sediments of an industrialised region of Northern Portugal. *Mycorrhiza* **2001**, *10*, 241–247.
- (21) Leyval, C.; Turnau, K.; Haselwandter, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **1997**, *7*, 139–153.
- (22) Tonin, C.; Vandenkoornhuyse, P.; Joner, E. J.; Straczek, J.; Leyval, C. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* **2001**, *10*, 161–168.
- (23) Gadd, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 3–49.
- (24) Veski, P. A.; Nockolds, C. E.; Allaway, W. G. Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. *Plant, Cell Environ.* **1999**, *22*, 149–158.
- (25) Panfili, F.; Manceau, A.; Sarret, G.; Spadini, L.; Kirpichtchikova, T.; Bert, V.; Laboudigue, A.; Marcus, M. A.; Ahamdach, N.; Libert, M. F. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy and principal components analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2005**, *69*, 2265–2284.

- (26) Manceau, A.; Marcus, M. A.; Tamura, N.; Proux, O.; Geoffroy, N.; Lanson, B. Natural speciation of Zn at the micrometer scale in a clayey soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2004**, *68*, 2467–2483.
- (27) Manceau, A.; Tommaseo, C.; Rihs, S.; Geoffroy, N.; Chateigner, D.; Schlegel, M.; Tisserand, D.; Marcus, M. A.; Tamura, N.; Chen, Z. S. Natural speciation of Mn, Ni and Zn at the micrometer scale in a clayey paddy soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2005**, *69*, 4007–4034.
- (28) Zabinsky, S. I.; Rehr, J. J.; Ankudinov, A.; Albers, R. C.; Eller, M. J. Multiple scattering calculations of X-ray absorption spectra. *Phys. Rev.* **1995**, *B52*, 2995–3009.
- (29) Frenkel, A. I.; Hills, C. W.; Nuzzo, R. G. A view from the inside: Complexity in the atomic scale ordering of supported metal nanoparticles. *J. Phys. Chem.* **2001**, *105*, 12689–12703.
- (30) DiCicco, A.; Berrettoni, M.; Stizza, S.; Bonetti, E.; Cocco, G. Microstructural defects in nanocrystalline iron probed by X-ray absorption spectroscopy. *Phys. Rev.* **1994**, *B50*, 12386–12397.
- (31) Heaton, D. N.; George, G. N.; Garrison, G.; Winge, D. R. The mitochondrial copper metallochaperone cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex. *Biochemistry* **2001**, *40*, 743–751.
- (32) Otte, M. L.; Matthews, D. J.; Jacob, D. L.; Moran, B. M.; Baker, A. J. M. Biogeochemistry of metals in the rhizosphere of wetland plants. An explanation for ‘innate’ metal tolerance. In *Developments in Ecosystems*; Wong, M. H., Ed.; Elsevier: 2004.
- (33) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Canters, G. W.; Loschi, L.; Righi, F.; Sola, M. Redox thermodynamics of blue copper proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 501–506.
- (34) Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
- (35) Huffman, D. L.; O’Halloran, T. V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 677–701.
- (36) Buettner, G. R.; Jurkiewicz, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiat. Res.* **1996**, *145*, 532–541.
- (37) Gadd, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* **1993**, *124*, 25–60.

- (38) Chisholm, J. E.; Jones, G. C.; Purvis, O. W. Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Miner. Mag.* **1987**, *51*, 715–718.
- (39) Lichtenegger, H. C.; Schoberl, T.; Bartl, M. H.; Waite, H.; Stucky, G. D. High abrasion resistance with sparse mineralization: copper biomineral in worm jaws. *Science* **2002**, *298*, 389–392.
- (40) Slocik, J. M.; Wright, D. W. Biomimetic mineralization of noble metal nanoclusters. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1135–1141.
- (41) Song, J.; Zhao, F. J.; Luo, Y. M.; McGrath, S. P.; Zhang, H. Z. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ. Pollut.* **2004**, *128*, 307–315.
- (42) Monson, C. F.; Woolley, A. T. DNA-templated construction of copper nanowires. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 359–363.
- (43) Jana, N. R.; Wang, Z. L.; Sau, T. K.; Pal, T. Seed-mediated growth method to prepare cubic copper nanoparticles. *Curr. Sci.* **2000**, *79*, 1367–1370.
- (44) Banerjee, I. A.; Yu, L.; Matsui, H. Cu nanocrystal growth on peptide nanotubes by biomineralization: Size control of Cu nanocrystals by tuning peptide conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *1000*, 14678–14682.
- (45) Horemans, N.; Foyer, C. H.; Potters, G.; Asard, H. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, *38*, 531–540.
- (46) Hering, J. G.; Stumm, W. Oxidative and reductive dissolution of minerals. In *Mineral-Water Interface Geochemistry*; Hochella, M. F. J., White, A. F., Eds.; Mineral. Soc. Am.: **1990**; Vol. 23, pp 427–465.
- (47) Singh, S.; Saxena, R.; Pandey, K.; Bhatt, K.; Sinha, S. 2004 Response of antioxidants in sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on different amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential. *Chemosphere* **2004**, *57*, 1663–1673.
- (48) Meharg, A. A. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol. Res.* **2003**, *107*, 1253–1265.
- (49) Bradley, R.; Burt, A. J.; Read, D. J. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* **1981**, *292*, 335–337.
- (50) Schützendübel, A.; Polle, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1351–1365.

- (51) Gonzalez-Chavez, C.; D'Haen, J.; Vangronsveld, J.; Dodd, J. C. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus spp.* (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* **2002**, *240*, 287–297.
- (52) Hildebrandt, U.; Regvar, M.; Bothe, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 139–146.
- (53) Gardea-Torresdey, J. L.; Tiemann, K. J.; Parsons, J. G.; Gamez, G.; Herrera, I.; Jose-Yacaman, M. XAS investigations into the mechanism(s) of Au(III) binding and reduction by alfalfa biomass. *Microchem. J.* **2002**, *71*, 193–204.
- (54) Gardea-Torresdey, J. L.; Parsons, J. G.; Gomez, E.; Peralta-Videa, J.; Troiani, H. E.; Santiago, P.; Yacaman, M. J. Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett.* **2002**, *4*, 397–401.
- (55) Gardea-Torresdey, J. L.; Gomez, E.; Peralta-Videa, J. R.; Parsons, J. G.; Troiani, H. E.; Yacaman, M. J. Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir* **2003**, *19*, 1357–1361.
- (56) Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; Parishcha, R.; Ajaykumar, P. V.; Alam, M.; Kumar, R.; Sastry, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 515–519.
- (57) Mukherjee, P.; Senapati, S.; Mandal, D.; Ahmad, A.; Khan, M. I.; Kumar, R.; Sastry, M. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem. Biol. Chem.* **2002**, *5*, 461–463.
- (58) Southam, G.; Beveridge, T. J. The in vitro formation of placer gold by bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, *58*, 4527–4530.
- (59) Greene, B.; Hosea, M.; McPherson, R.; Henzl, M.; Alexander, M. D.; Darnall, D. W. Interaction of gold(I) and gold(III) complexes with algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, *20*, 627–632.
- (60) Battke, F.; Ernst, D.; Halbach, S. Ascorbate promotes emission of mercury vapour from plants. *Plant, Cell Environ.* **2005**, *28*, 1487–1495.
- (61) Shotyk, W. Review of the inorganic geochemistry of peats and peatland waters. *Earth Sci. Rev.* **1988**, *25*, 95–176.
- (62) Marcus, M. A.; MacDowell, A. A.; Celestre, R.; Manceau, A.; Miller, T.; Padmore, H. A.; Sublett, R. E. Beamline 10.3.2 at ALS: a hard X-ray microprobe for environmental and materials sciences. *J. Synchrotron Radiat.* **2004**, *11*, 239–247.

- (63) Proux, O.; Nassif, V.; Prat, A.; Ulrich, O.; Lahera, E.; Biquard, X.; Menthonnex, J. J.; Hazemann, J. L. Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. *J. Synchrotron Radiat.* **2006**, 13, 59–68.

Supporting information for

Formation of Metallic Copper Nanoparticles at the Soil-Root Interface

Alain Manceau¹, Kathryn L. Nagy², Matthew A. Marcus³, Martine Lanson¹, Nicolas Geoffroy¹,
Thierry Jacquet⁴ and Tatiana Kirpichtchikova^{1,4}

¹LGIT-Maison des Géosciences, CNRS and Université J. Fourier, 38041 Grenoble Cedex 9,
France

²Department of Earth and Environmental Sciences, 845 West Taylor Street, MC-186,
University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60607, USA

³Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory, One Cyclotron Road,
Berkeley, CA 94720, USA

⁴Phytorestore-Site et Concept, Hôtel Vigée Le Brun, 8 rue du Sentier, 75002 Paris, France

1 - Field experiments

The phytoremediation experiment was conducted from May 2002 to September 2003 near Avrigny, France. Two holes $4 \times 4 \text{ m}^2$ at the surface and 40 cm deep were dug in the ground, lined with a permeable membrane, and configured with basal drains to collect percolating irrigation waters. Soil aeration was achieved with a horizontal network of pipes at the depth of the liner connected to the surface by vertical pipes (capped to prevent ingress of precipitation) at 9 locations per pot. The two pots were filled with soil from the Pierrelaye plain (1), and vegetated with *Iris pseudoacorus* (Pot A) and *Phragmites australis* (Pot B). Initial concentrations of Zn, Pb, and Cu in the pot soil were 1103, 535, and 290 mg/kg, respectively. The two pots were exposed to natural precipitation and also irrigated. From May 2002 to early September 2003, the typical tri-weekly irrigation schedule for Pot A, expressed as amount of precipitation, was 100 mm (three times the average monthly precipitation) on the first day in week 1 and 6 mm per day for each of five consecutive days in week 2 and then again in week 3. From September 23 to October 14, 2002, Pot A was irrigated instead once per week with 25 mm of 0.05 M citrate (in water at pH 5.5) followed by flushing with 100 mm of water four days later. This removed about 20% of the initial Cu from Pot A as soluble copper-citrate complexes, which are not degraded easily by microbes (2), consistent with the higher effluent Cu concentrations observed (up to $\sim 10^{-5} \text{ M}$ in Pot A vs. $\sim 10^{-7} \text{ M}$ in Pot B). Pot B was watered with 100 mm on the first day of every week in anticipation of simulating periodic redox conditions expected during heavy rainfalls. However, thermodynamic calculations presented below show that Pot B remained dominantly in the stability field of Cu^{2+} species and rarely entered the stability field of Cu^+ species which may be due to the aeration as well as a high flux rate of water through the soil. Neither pot was watered from July 7-21 in 2003. The European heat wave in the summer of 2003 (3,4) extended from June through August, and the experimental site is located in a part of France in which air temperatures rose to their highest values ($>30^\circ\text{C}$) in the first two weeks of August (5). However, temperatures declined to normal in the latter part of August, and the plants were still flourishing at the time of sampling in September 2003. At the end of the 16-month experiment, stems and leaves of *I. pseudoacorus* and *P. australis* contained only 0.14% and 0.03% of the initial soil Cu, respectively. Therefore, copper was accumulated only in root systems as expected for metal-tolerant plants.

2 - Association of Cu⁰ with fungal hyphae in the rhizosphere of *I. pseudoacorus*

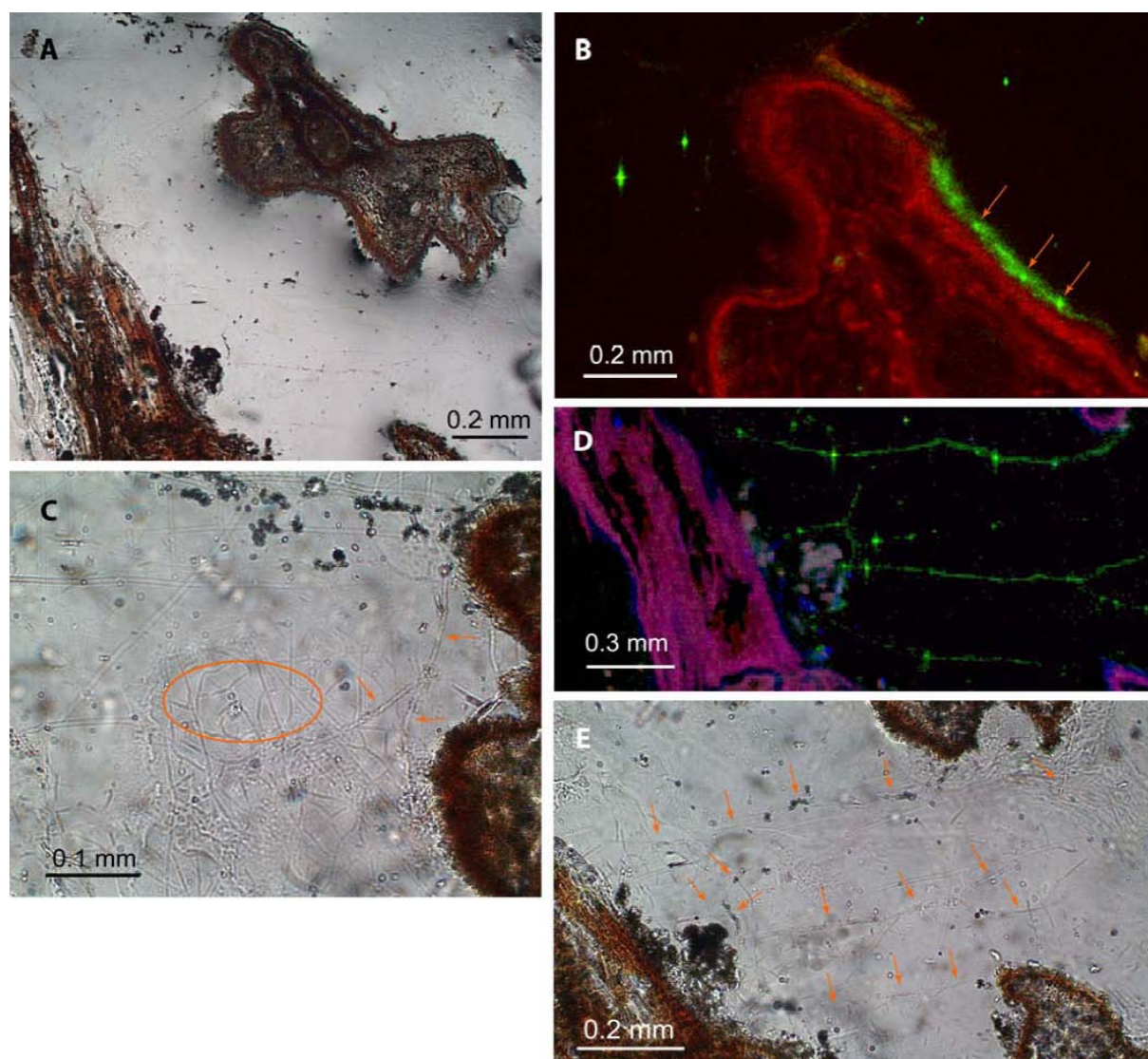


Fig. S1: (A) Longitudinal and transversal sections of roots from the rhizosphere of *I. pseudoacorus*. (B) Distribution of Zn (red) and Cu (green) in a layer at the surface of the root sectioned transversally in the optical micrograph S1A. The biofilm contains Cu(II) sorbed to organic matter (likely fungal hyphae) and Cu⁰ grains pointed out with arrows. (C) Tangle of filamentous cells in the upper left region of S1A. Enlarging the image shows the presence of at least two kinds of filament morphologies (i.e., fungal species). (D-E) Fluorescence map and optical image of the lower region from S1A (Ca coded in blue). This close-up shows that the Cu⁰ grains are aligned along the direction of fungal hyphae pointed out with arrows.

3 - Thermodynamic equilibria and redox potentials

Thermodynamic calculations using The Geochemist's Workbench (6), and assuming that effluent Cu concentrations represent uncomplexed or "free" copper ions, show that measured Eh-pH values straddled boundaries between the fields of dominance of Cu^{2+} and Cu^+ species with no evidence that solutions entered the field of dominance of Cu^0 , except intermittently in Pot A from May 5 to July 16, 2003 (Fig. S2A; Effluent solutions were not analyzed after July 16 for Pot A and after July 31 for Pot B). Dissolved copper would have been effectively completely bound to the dissolved organic carbon (DOC) (~10 mg/L on average in Pot B and 750 mg/L declining to ~130 mg/L in Pot A after citrate addition) based on binding constants for Cu to organic functional groups. Binding to DOC would have lowered the amount of free inorganic copper causing an increase in the dominance of aqueous copper species over solid species at the measured Eh-pH conditions of both pots, thus lessening even more the likelihood of abiotic precipitation of Cu^0 in Pot A.

Starting in May 2003, the changes in Eh in Pot A positively correlated with the changes in pH, suggesting periodic triggering of one or more redox reactions (Fig. S2B). The correlation began well before the peak of the heat wave in 2003 and was not observed in Pot B. Because Pot A received less water, its soil may have begun to dry increasing dissolved copper and hydroxyl concentrations and initiating enhanced plant and/or fungal defenses against the higher copper concentrations. Increased biological production of one or more active reducing agents would simultaneously lower pH and Eh, and thus precipitate copper metal. Subsequent watering would have reduced the oxidative stress bringing the system back to higher pH and Eh values. These Eh-pH changes also might be related to a shift in community balance between arbuscular mycorrhizal fungi, expected in alkaline environments (7), and ericoid mycorrhizal fungi, known to inhabit metal-contaminated acidic environments (8, 9) and to impart copper resistance to plants (10). Other biological processes could change pH, but not Eh simultaneously including for example, enhanced production by endomycorrhizal fungi of organic (citric and/or oxalic (11)) acids used to complex and precipitate excess Cu or bacterial decomposition of organic matter to produce CO_2 . Thus, only a biotically mediated redox reaction is indicated by the Eh-pH data, while a direct causative effect of higher air temperatures is inconclusive.

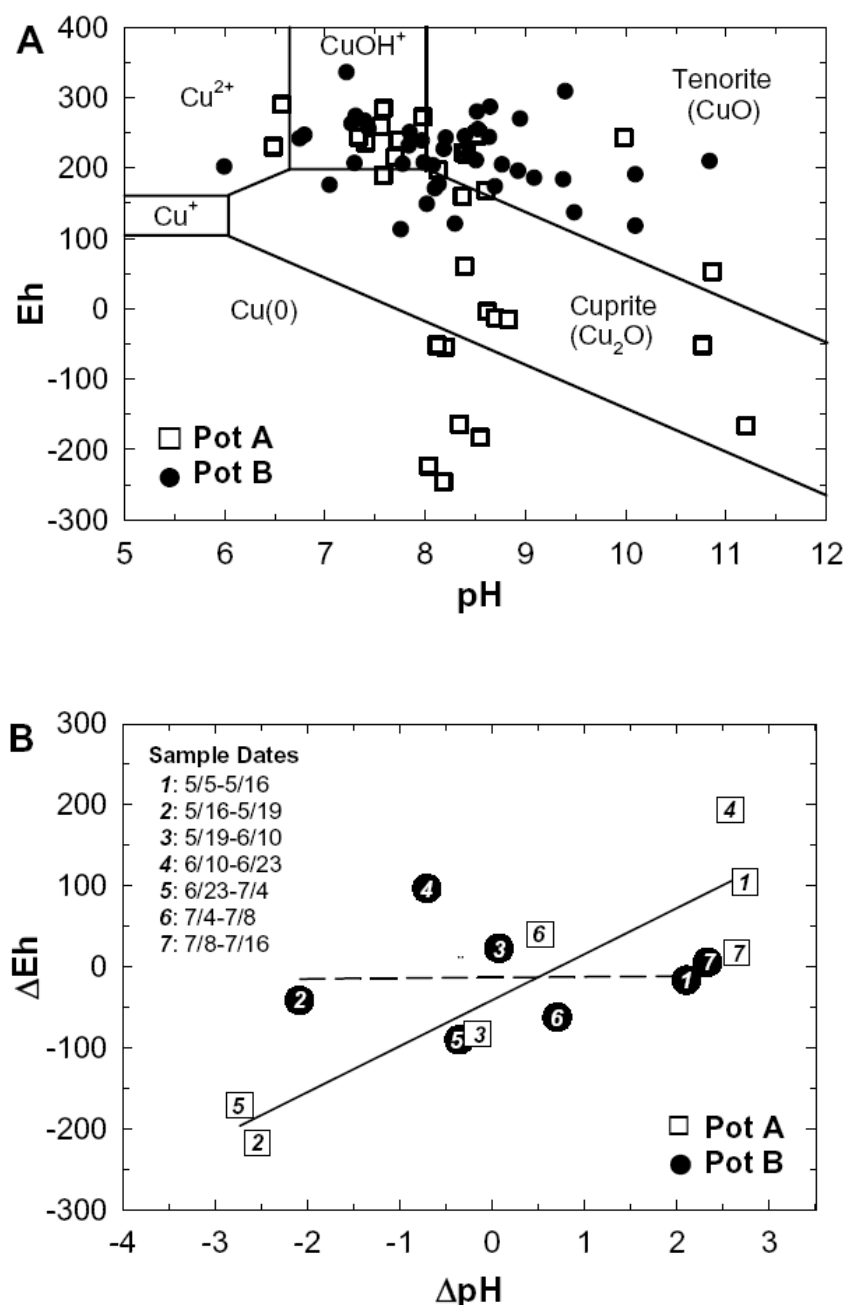


Fig. S2: (A) Eh-pH diagram for a 25°C solid-aqueous system with 10^{-7} M dissolved Cu showing fields of dominance of Cu species and measured parameters in pot effluents. Fields of dominance for Cu^+ aqueous species enlarge slightly at 35°C and shrink slightly at 5°C for $[\text{Cu}(\text{aq})_{\text{total}}] = 10^{-7}$ M, and disappear completely at 5-35°C for $[\text{Cu}(\text{aq})_{\text{total}}] = 10^{-5}$ M. Fields of dominance for all solid phases shift to higher pH and lower Eh as $[\text{Cu}(\text{aq})_{\text{total}}] \rightarrow 0$. (B) Change in Eh vs. change in pH for pot solutions from May 5 to July 16, 2003. Data from Pot B are uncorrelated ($r^2 = 4.3 \times 10^{-4}$), but data from Pot A are correlated linearly with a slope of 56.8, intercept of -41.1 mV at $\Delta\text{pH} = 0$ and $r^2 = 0.835$, suggesting that the changes are driven by one or more redox reactions in Pot A.

We proposed that biotic ascorbic acid production would drive the reduction of toxic copper cations. The half cell potential of the dehydroascorbate/ascorbic acid couple is lower than those for any copper couples and therefore ascorbic acid theoretically could reduce cationic copper (Table S1). However, this reduction cannot occur in a solution of free copper cations (12) and appears to be facilitated only in the presence of a templating substrate (13, 14), such as fungal hyphae (Fig. S1B). Additionally, the cellular redox environment is regulated by multiple reactions many of which involve radical intermediates, including the ascorbate radical (15-17). Thus, although increased production of ascorbic acid by rhizosphere biota is proposed here as the key step in the reduction mechanism, the situation may be more complex, as outlined for Hg^{2+} reduction to Hg^0 in barley (18).

Table S1. Redox potentials of reducible metals by biota and ascorbic acid.

Half-reaction ¹	E ⁰ , Standard Electrode Potential (V) ²
$\text{Au}^+ + \text{e}^- = \text{Au(s)}$	1.83
$\text{Au}^{3+} + 3\text{e}^- = \text{Au(s)}$	1.52
$\text{Ag}^+ + \text{e}^- = \text{Ag(s)}$	0.80
$\text{Hg}^{2+} + 2\text{e}^- = 2\text{Hg(l)}$	0.80
$\text{H}_2\text{SeO}_3(\text{aq}) + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- = \text{Se(s)} + 3\text{H}_2\text{O}$	0.74
$\text{Te}^{4+} + 4\text{e}^- = \text{Te(s)}$	0.57
$\text{Cu}^+ + \text{e}^- = \text{Cu(s)}$	0.52
$\text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^- = \text{Cu(s)}$	0.34
$2\text{Cu}^+ = \text{Cu(s)} + \text{Cu}^{2+}$	0.18
$^3\text{DHAA} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{AA}$	0.08

¹Cations in all half-reactions are aqueous species. Note that certain half reactions are pH-dependent.

²Half-cell potentials from (19, 20).

³Dehydroascorbate-ascorbic acid reaction can involve intermediate ascorbate radical forms, not shown here (15-17).

4 - Cu speciation in the rhizosphere

Initial soil. The binding mechanism of Cu in the initial soil was determined by comparing the unknown spectra with those from a large database of spectral references, including Cu complexed to low molecular-weight aqueous organic acids (acetate, citrate) and to humic acids from the Elliott soil and Florida peat of the International Humic Substances Society (IHSS). In all cases, Cu was observed to be bound to carboxylic functional groups, as described in the literature (21-26).

Nature of Cu nanocrystals in the phytoremediated soil. The only change in copper speciation was the appearance of the Cu⁰ metallic species. No evidence was seen for the formation of other rarely reported copper biominerals which all contain Cu⁺ or Cu²⁺: copper-sulfide (27), copper oxalate (11, 28), or atacamite (29).

Data were simulated with the FEFF 7.01 code (30). Structural parameters were determined by Fourier-filtering the data in real space over the [1.4 - 5.4 Å] $R+\Delta R$ interval, and least-squares fitting the filtered spectrum over the [3.0 - 12.4 Å⁻¹] k interval. Contributions from multiple-scattering paths were added to the fits, and metallic Cu was used as reference for calibrating the many-body amplitude reduction factor S_0^2 , and verifying the correctness of the mean-free path of the electron λ , and the amplitude and phase shift functions.

Proportion of Cu bound to organics in the Cu nanocrystals. The radial structure function of the μ -EXAFS spectrum for the Cu organic species has a prominent peak at $R+\Delta R = 1.5$ Å, assigned to the Cu-O pair at $R = 1.94$ Å (Fig. S3). If 40% of the Cu organic signal is added to 100% of the EXAFS signal for the Cu grains, and the composite spectrum is Fourier transformed, the organic component, now at 29% of the total signal, manifests itself in the appearance of a shoulder on the left side of the Cu-Cu peak. The imaginary part of the Fourier transform has a minimum at $R+\Delta R = 1.35$ Å, and otherwise oscillates about $y = 0$ in the absence of Cu-O pairs. Thus, the maximum fraction of Cu bound to organics needed to bring the curve representing the mixture to within the precision of the Fourier transform for the Cu grains (i.e., a distance midway between the curves for the Cu grains and mixture of Cu-grains + Cu-organics) is estimated to be 15%. This simulation also shows that EXAFS has a high sensitivity to multi-atom Cu⁰ clusters, because the signal from the C shells for the Cu organic component is weak in comparison to that from the Cu shells.

Proportion of Cu⁰ in the remediated soils. The bulk EXAFS spectra were recorded at 10 K, whereas μ -EXAFS spectra can be recorded only at room temperature with current

instrumentation at synchrotron facilities. The proportions of each Cu species were bracketed by decomposing the bulk spectra alternately with that of massive Cu metal at 10 K (lower bound) and that of the Cu nanoparticle aggregates at room temperature (upper bound).

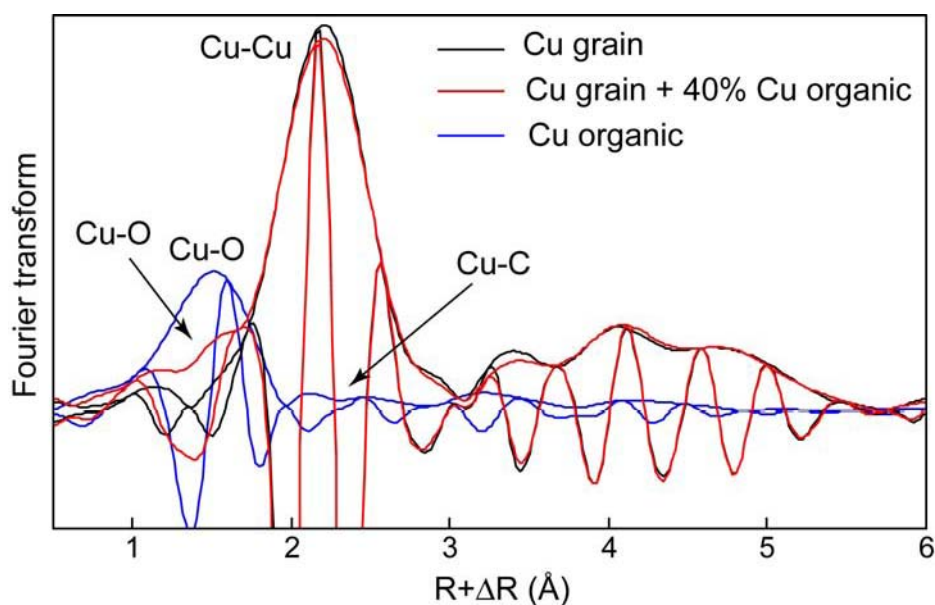


Fig. S3: Fourier transforms (modulus plus imaginary part) of the μ -EXAFS spectra from Figure 2A (Cu organic) and 2B (Cu grain), and from the composite spectrum corresponding to a mixture of 100% Cu grains + 40% Cu organic.

5 - Detection of Cu⁰ crystallites by XRD

The presence of a visible diffraction ring on the XRD patterns of some Cu grains indicates that these spots contain crystallized Cu⁰ particles. Diffraction sees preferentially the largest particles, while EXAFS sees every atom in every particle equally. Thus, we need to know what proportion of Cu atoms is in the diffracting crystallites. In order to demonstrate how many crystallites are required to produce a smooth powder ring, we simulated the diffraction from a set of randomly oriented particles. Each crystallite was considered to produce diffraction intensity centered around each of the eight equivalent reflections produced by the {111} planes of metallic copper. For particles of radius r , the diffracted intensity was described as :

$$I_p(q) = \begin{cases} \exp(-(qr)^2 / 5) & qr \leq q_0 \\ 9 / (2q^4 r^4) & qr > q_0 \end{cases}$$

where $q_0 = 4.9440 \text{ \AA}^{-1}$ is chosen to make this function continuous and $q = |q_{scatt} - g_{hkl}|$. Here, q_{scatt} is the scattering wavevector and g_{hkl} is the Bragg vector for the hkl reflection. This form was chosen to have the correct Guinier and Porod limits for a spherical particle, but not the oscillations seen in the exact form. This assumed form allows for polydispersity and non-spherical shapes. We then rotated the crystallites about random axes by random amounts, and for each crystallite calculated the diffracted intensity at various angles along the Debye ring. Adding up the contributions for all reflections from all crystallites yields the simulated powder pattern. We then adjusted the number of crystallites to yield a “smooth” diffraction ring as defined by a standard deviation of intensity along the ring equal to 10% of the mean.

This calculation also produces a version of the Debye formula relating domain size to peak width. By performing an angular integration on our assumed peak shape, we find that the domain radius is given by $\max r = 0.6dq_{max} / \Delta q$, where d is the d -spacing, q_{max} is the wave vector of the peak, and Δq is the FWHM (Full Width at Half Maximum) of the peak. The result is that about 250,000 crystallites are required to produce a smooth ring for an effective diameter ($2r$) of the diffracting crystallites of 140 Å on average. Each crystallite has a volume of about $1.4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^3$, so the minimum volume of diffracting particles in the beam is about 0.36 \AA^3 . For a probe volume of $16 \times 7 \times 30 \text{ \AA}^3$, the crystallite volume fraction is $1.1 \cdot 10^{-4}$, and the column density of Cu is equivalent to a metallic Cu foil with an effective thickness of about 32 Å. Since this amount of Cu is unlikely to produce as strong a fluorescence signal as we see in EXAFS and XRF, most of the Cu⁰ in the diffracting spots must be nanoparticles which do not diffract effectively.

6 - Literature cited

- (1) Kirpichtchikova, T.; Manceau, A.; Spadini, L.; Panfili, F.; Marcus, M. A.; Jacquet, T. Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2006**, 70, 2163-2190.
- (2) Francis, A. J.; Dodge, C. J.; Gillow, J. B. Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility. *Nature* **1992**, 356, 140-142.
- (3) Beniston, M. The 2003 heat wave in Europe: A shape of things to come? An analysis based on Swiss climatological data and model simulations. *Geophys. Res. Lett.* **2004**, 31, L02202.
- (4) Schär, C.; Vidale, P. L.; Lüthi, D.; Frei, C.; Häberli, C.; Liniger, M. A.; Appenzeller, C. The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature* **2004**, 427, 332-336.
- (5) NASA, http://visibleearth.nasa.gov/view_rec.php?id=16544 (2007).
- (6) Bethke, C. M. *The Geochemist's Workbench®-v. 4.0*. University of Illinois 2002.
- (7) Meharg, A. A. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol. Res.* **2003**, 107, 1253-1265.
- (8) Cairney, J. W. G.; Meharg, A. A. Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities. *Environ. Poll.* **1999**, 106, 169-182.
- (9) Cairney, J. W. G.; Meharg, A. A. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *Eur. J. Soil Sci.* **2003**, 54, 735-740.
- (10) Bradley, R.; Burt, A. J.; Read, D. J. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* **1981**, 292, 335-337.
- (11) Gadd, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* **2007**, 111, 3-49.
- (12) Jana, N. R.; Wang, Z. L.; Sau, T. K.; Pal, T. Seed-mediated growth method to prepare cubic copper nanoparticles. *Curr. Sci.* **2000**, 79, 1367-1370.
- (13) Slocik, J. M.; Moore, J. T.; Wright, D. W. Monoclonal antibody recognition of histidine-rich peptide encapsulated nanoclusters. *Nano Lett.* **2002**, 2, 169-173.

- (14) Slocik, J. M.; Wright, D. W. Biomimetic mineralization of noble metal nanoclusters. *Biomacromol.* **2003**, *4*, 1135-1141.
- (15) Buettner, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535-543.
- (16) Buettner, G. R.; Jurkiewicz, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Rad. Res.* **1996**, *145*, 532-541.
- (17) Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191-1212.
- (18) Battke, F.; Ernst, D.; Halbach, S. Ascorbate promotes emission of mercury vapour from plants. *Plant, Cell Environ.* **2005**, *28*, 1487-1495.
- (19) White, A.; Handler, P.; Smith, E. L. *Principles of Biochemistry*, 5th ed. New York, McGraw-Hill: 1973; p 1295.
- (20) Bard, A. J.; Parsons, R.; Jordan, J. *Standard Potentials in Aqueous Solutions*. IUPAC (Marcel Dekker), New York, USA,: 1985.
- (21) Hesterberg, D.; Sayers, D. E.; Zhou, W.; Robarge, W. P.; Plummer, G. M. XAFS characterization of copper in model aqueous systems of humic acid and illite. *J Phys IV* **1997**, *7*, 833-834.
- (22) Xia, K.; Bleam, W.; Helmke, P. A. Studies of the nature of Cu^{2+} and Pb^{2+} binding sites in soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, *61*, 2211-2221.
- (23) Xia, K.; Bleam, W.; Helmke, P. A. Studies of the nature of binding sites of first row transition elements bound to aquatic and soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, *61*, 2223-2235.
- (24) Korshin, G. V.; Frenkel, A. I.; Stern, E. A. EXAFS study of the inner shell structure in copper(II) complexes with humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 2699-2705.
- (25) Frenkel, A. I.; Korshin, G. V. Studies of Cu(II) in soil by X-ray absorption spectroscopy. *Canad. J. Soil Sci.* **2001**, *81*, 271-276.
- (26) Alcacio, T. E.; Hesterberg, D.; Chou, J. W.; Martin, J. D.; Beauchemin, S.; Sayers, D. E. Molecular scale characteristics of Cu(II) bonding in goethite-humate complexes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, *65*, 1355-1366.
- (27) Gadd, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* **1993**, *124*, 25-60.

- (28) Chisholm, J. E.; Jones, G. C.; Purvis, O. W. Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Miner. Mag.* **1987**, *51*, 715-718.
- (29) Lichtenegger, H. C.; Schoberl, T.; Bartl, M. H.; Waite, H.; Stucky, G. D. High abrasion resistance with sparse mineralization: copper biomineral in worm jaws. *Science* **2002**, *298*, 389-392.
- (30) Ankudinov, A. L.; Ravel, B.; Rehr, J. J.; Conradson, S. D. Real space multiple scattering calculation of XANES. *Phys. Rev.* **1998**, *B58*, 7565-7576.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La phytoremédiation des sols pollués par des métaux lourds apparaît comme une voie alternative, moins coûteuse, plus extensive, plus respectueuse des sols et de l'environnement, et plus acceptable pour la réhabilitation des sols, par rapport aux techniques physico-chimiques, lourdes et souvent destructives telles que l'incinération et le confinement, qui sont actuellement employées à grande échelle pour traiter les sols pollués par des métaux. Malgré leurs atouts certains et leur intérêt grandissant dans le contexte de la protection des ressources en sols, les méthodes actuelles de phytoremédiation ne sont encore que peu appliquées, et pour des cas particuliers, et ceci surtout puisqu'elles ne permettent généralement pas d'obtenir une dépollution satisfaisante du sol dans un temps raisonnable. La phytoextraction par des plantes hyperaccumulatrices et la phytoextraction assistée par des chélatants nécessitent souvent de nombreuses années pour ramener le sol à un seuil acceptable. Par ailleurs, ces méthodes sont peu appropriées au traitement des sols fortement contaminés avec une pollution polymétallique. Il existe donc aujourd'hui un besoin récurrent de nouvelles solutions de phytoremédiation, qui permettent d'obtenir une dépollution satisfaisante, pour une large gamme de métaux, et qui assurent tout à la fois une gestion simplifiée des polluants, en association avec des coûts de fonctionnement acceptables et avec des temps de traitement raisonnables.

Dans ce contexte, ce travail a porté sur une approche conceptuellement nouvelle et originale de la phytoremédiation, selon le procédé de **Jardins Filtrants**, dont le principe consiste à traiter le sol dans le dispositif des casiers, végétalisés avec des plantes de milieux humides et irrigués de manière à imposer une alternance des conditions physico-chimiques du milieu entre des périodes d'hydromorphie et d'assèchement, à l'image de l'environnement

de zones humides, et ceci dans le but de favoriser la remobilisation et la lixiviation des métaux présents dans le sol, puis leur piégeage consécutif dans un filtre en tourbe.

Les plantes utilisées dans ce travail, en particulier, le roseau commun (*Phragmites australis*), l'iris des marais (*Iris pseudacorus*) et le saule des vanniers (*Salix viminalis*), sont en premier lieu des plantes de milieux humides, bien adaptées aux conditions hydromorphie/assèchement, et couramment utilisées dans les réalisations des Jardins Filtrants. Ces plantes sont tolérantes vis-à-vis des métaux lourds, elles se caractérisent par une forte biomasse racinaire et aérienne, permettant d'obtenir une importante surface de contact avec le sol et un important couvert végétal, et par conséquent, un volume important de rhizosphère et un taux important d'évapotranspiration. Ces plantes de milieux humides ont été choisies, avant tout, pour leur aptitude commune à s'adapter aux conditions d'inondation, grâce à leurs systèmes vasculaires uniques permettant de transporter l'oxygène des feuilles vers les racines à travers des canaux d'aérenchymes et d'émettre ainsi l'oxygène dans le sol, puis, pour leurs différences physiologiques en morphologie et développement des systèmes racinaires.

Le sol issu de la plaine de Pierrelaye, utilisé dans ce travail, a été choisi pour le caractère polymétallique de sa pollution (Zn, Cu, Pb), qui est un cas typique de la pollution des terres agricoles suite à l'épandage des eaux usées et des boues.

L'objectif principal de ce travail était de comprendre les mécanismes de transformations biogéochimiques, ou de remobilisation et d'immobilisation des métaux lourds, et plus particulièrement du zinc et du cuivre, intervenant dans le système sol-plante lors de la phytoremédiation avec l'approche de Jardins Filtrants. L'objectif à terme de l'essai de phytoremédiation dans ce travail visait à développer une solution de phytoremédiation *ex situ*, permettant de dépolluer le sol dans un temps raisonnable, dans l'optique de l'élaboration d'un centre de phytoremédiation selon le procédé de Jardins Filtrants. Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi de conduire l'expérience de la phytoremédiation selon le principe de Jardins Filtrants en conditions réelles et en vraie grandeur. Du fait de la complexité et de l'hétérogénéité du système, une démarche analytique multi-échelles et multi-techniques a été mise en œuvre.

L'expérience de la phytoremédiation dans le cadre de ce travail a été menée sur la période de seize mois, à l'échelle d'un site pilote représentant un « jardin filtrant » grandeur nature, décliné en prototypes selon diverses modalités. Le dispositif du site pilote a été constitué des casiers de traitement, où le sol pollué a été mis en culture avec des plantes de milieux humides (*Iris pseudacorus*, *Phragmites australis* et *Salix viminalis*), et d'un casier de piégeage des lixiviats issus des casiers de traitement, dans un filtre en tourbe végétalisée avec les mêmes plantes. Les casiers de traitement ont été soumis à l'irrigation artificielle à l'eau, avec une alternance des périodes de mise en eau et d'assèchement. En outre, sur ce

site pilote, un traitement chimique complémentaire avec un réactif chélatant (le citrate) a été testé.

Le bilan de la phytoremédiation a été établi à l'échelle macroscopique, tout d'abord en termes de concentrations totales, afin de quantifier la répartition des métaux entre le sol, les plantes et les lixiviats. Les mesures des concentrations des métaux dans le sol, avant et après phytoremédiation, et les mesures de la biomasse des plantes et des concentrations des métaux dans les plantes (racines et parties aériennes) après phytoremédiation, ont permis de déterminer le stock des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation et la quantité des métaux accumulés dans les plantes. La quantité des métaux extraits vers les lixiviats a été estimée d'après la variation de stock dans le sol et la quantité accumulée dans les plantes.

Le cœur de ce travail a reposé sur la caractérisation de la spéciation du zinc et du cuivre dans la phase solide du sol, avant et après phytoremédiation, avec une approche moléculaire, par l'utilisation conjointe de techniques physiques de caractérisation sur la source synchrotron (μ SXRF, μ XRD, μ EXAFS et EXAFS) associée au traitement statistique des données, en couplant les investigations à l'échelle microscopique et à l'échelle macroscopique. A l'échelle microscopique, l'utilisation combinée des techniques de micro-analyses latéralement résolues (μ SXRF, μ XRD, μ EXAFS), sur les échantillons non-perturbés de sol, préparés sous forme de lames minces, a permis d'identifier les formes chimiques et structurales du zinc et du cuivre dans le sol avant et après phytoremédiation. A l'échelle macroscopique, l'utilisation de la spectroscopie EXAFS non-résolue latéralement, couplée aux analyses chimiques, sur les échantillons moyens de sols sous forme de poudre, a permis de quantifier les formes du zinc et du cuivre dans le sol avant et après phytoremédiation, et ainsi de mettre en évidence les changements de la spéciation induits par la phytoremédiation. Cette approche s'est avérée particulièrement adaptée pour l'étude de ce type de matrice, permettant d'acquérir une connaissance quasi complète de l'ensemble des phases porteuses du zinc et du cuivre, en dépit du caractère hétérogène et polyphasique du sol.

L'étude du sol pollué à l'état initial a permis de caractériser le sol, de déterminer la spéciation originelle du zinc et du cuivre dans le sol, d'évaluer dans les conditions du laboratoire la solubilité des métaux avec trois chélatants organiques : EDTA, EDDS et citrate, et de choisir un réactif approprié pour l'application dans les conditions du site pilote. Il a été montré que le zinc dans le sol initial est associé majoritairement à des minéraux zincifères secondaires : la ferrihydrite (~30 %), le phosphate (~28 %) et un phyllosilicate zincifère modélisé par la kérolite (~24 %), et dans des moindres proportions à des minéraux primaires : la willémite (Zn_2SiO_4 , ~11 %) et la gahnite (ZnAl_2O_4 , <10 %), avec une précision

de ± 10 % du zinc total. A la différence du zinc, le cuivre dans le sol initial est associé essentiellement à des groupes carboxyliques de la matière organique. Les extractions chimiques avec les chélatants ont montré que le citrate, qui est un chélatant naturel, est aussi efficace que les chélatants synthétiques, EDTA et EDDS, pour l'extraction des métaux, dans l'ordre d'efficacité : $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Pb}$. La cinétique de l'extraction est suffisamment rapide pour ne pas interférer de façon importante avec des systèmes de transport des ions vers la plante. Le citrate forme avec des métaux des complexes en solution. Les métaux ainsi solubilisés sont susceptibles d'être lixiviés du sol ou de devenir disponibles pour les plantes si les complexes sont dissociables à l'interface sol-racine. Les analyses EXAFS des résidus du sol après les extractions, couplées à des analyses chimiques et des calculs thermodynamiques, ont permis de montrer que dans ce type de sol, parmi les phases porteuses du zinc, le phosphate zincifère est le plus labile au contact des chélatants, il se dissout préférentiellement aux autres phases. L'application des chélatants au sol en plusieurs cycles, en renouvelant le ligand après chaque cycle, favorise la dissolution des formes moins labiles, et permet ainsi de libérer davantage de métaux. Sur la base de ces résultats, et en raison de la bonne biodégradabilité du citrate, le traitement au citrate a été testé sur le site pilote. L'étude dans les conditions du site pilote a montré, par la suite, que les effets du citrate sur le sol, observés dans les conditions du site pilote, en présence des plantes, sont qualitativement similaires à ceux observés au laboratoire, en absence des plantes.

La suite du travail a été consacrée à l'étude des mécanismes biogéochimiques impliqués dans la phytoremédiation dans le dispositif du site pilote. Pour cela, le bilan de la phytoremédiation a été établi en termes de concentrations totales. La répartition des métaux entre le sol, les plantes et les lixiviats a été quantifiée. La spéciation résiduelle du zinc et du cuivre dans le sol a été déterminée, et comparée à leur spéciation originelle. Le bilan des phases porteuses du zinc et du cuivre dans le sol a été établi, et les mécanismes intervenant lors de la phytoremédiation ont été mis en évidence.

L'objectif à terme de l'essai de phytoremédiation selon le principe de Jardins Filtrants dans ce travail visait à développer une solution de traitement permettant d'obtenir une dépollution satisfaisante du sol pour une gamme des métaux dans un temps raisonnable. Les résultats obtenus sur le site pilote, pour la période de seize mois, montrent que la phytoremédiation selon le principe de Jardins Filtrants présente un bon potentiel. Les mesures des concentrations des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation ont montré qu'en seize mois de traitement les concentrations des métaux dans le sol ont été réduites de 36-50 % (Zn), 17-39 % (Pb) et 4-27 % (Cu), en moyenne pour les sols de trois

plantes utilisées, sans traitement au citrate, et de 45-65 % (Zn), 21-45 % (Pb), et 22-51 % (Cu), avec traitement au citrate. Pour les sols de trois plantes, sans ou avec traitement au citrate, l'extraction des métaux du sol se situe dans l'ordre décroissant de mobilité : $Zn > Pb > Cu$. L'extraction des métaux du sol dans ce dispositif des casiers résulte de l'action des plantes, et plus précisément de l'activité racinaire, en conjonction avec l'irrigation (plus le citrate lorsqu'il est appliqué). Du fait du gradient d'influence racinaire, l'extraction la plus importante a été obtenue au niveau du sol colonisé par les racines. Les fourchettes des valeurs ci-dessus présentent alors le gradient d'extraction, entre les valeurs minimales obtenues dans le sol en surface du casier, en dehors des systèmes racinaires, et les valeurs maximales obtenues dans le sol en profondeur du casier, au niveau des systèmes racinaires. Les mesures de la biomasse végétale et des concentrations des métaux dans la biomasse végétale ont permis de montrer que la quantité des métaux extraits par l'accumulation dans les plantes (racines plus parties aériennes) est faible, et non-significative par rapport au stock initial dans le sol (<0.3 % du stock initial dans le sol, pour chaque métal et pour chaque plante, sans ou avec citrate). Dans ce dispositif, le mécanisme de la phytoaccumulation n'est impliqué que de manière marginale. L'établissement d'une balance de masse des métaux, entre les métaux dans le sol avant phytoremédiation, les métaux dans le sol après phytoremédiation (en moyenne pour l'ensemble du sol en dehors et au niveau des systèmes racinaires) et les métaux dans les plantes, a permis d'estimer la quantité des métaux extraits du sol par la lixiviation. Cette quantité lixiviée apparaît considérable au regard de la quantité accumulée dans les plantes, et par rapport au stock initial dans le sol (36 à 71 % de Zn, 21 à 58 % de Pb, 5 à 58 % de Cu du stock initial dans le sol, selon la plante, sans ou avec citrate). Le principal mécanisme impliqué dans la décontamination du sol dans ce dispositif des casiers végétalisés avec ces plantes de milieux humides apparaît donc une lixiviation, induite par l'activité racinaire en conjonction avec l'irrigation (plus le citrate lorsqu'il est appliqué), qui est désignée globalement par le terme **phytolixiviation**. Le suivi périodique des concentrations des éléments dans les lixiviats a permis de confirmer la migration des métaux vers les lixiviats au cours du traitement. Il faut noter que le dispositif des casiers n'a pas été adapté à la mesure directe et continue du flux de la lixiviation, et le suivi des lixiviats dans le cadre de ce travail n'a pas permis d'établir un bilan quantitatif du flux de la lixiviation à partir de la phase liquide. Néanmoins, l'étude de la spéciation des métaux dans la phase solide du sol, dans le cadre de ce travail, a permis d'établir le bilan quantitatif des phases porteuses des métaux dans le sol avant et après phytoremédiation, et de mettre ainsi en évidence les processus majeurs responsables de la lixiviation. Les résultats de l'étude de la spéciation, mis en parallèle avec les résultats du suivi des lixiviats, ont permis, par la suite, de décrire le phénomène de la lixiviation au cours du traitement en fonction des conditions physico-chimiques.

Trois espèces végétales de milieux humides testées dans ce travail, dans le dispositif des casiers, avec une densité de plantation de 2 plantes/m², pendant seize mois de culture soit un cycle végétal annuel complet plus un été, ont montré de bonnes capacités de phytolixiviation. *Iris pseudacorus* et *Salix viminalis* ont montré des capacités similaires, permettant d'éliminer jusqu'à 37 et 38 % de Zn, 23 et 24 % de Pb, 7 et 8 % de Cu (sans citrate) et 51 et 61 % de Zn, 29 et 30 % de Pb, 30 et 48 % de Cu (avec citrate) dans le sol au niveau des systèmes racinaires. Au regard de ces deux espèces, la capacité de phytolixiviation de *Phragmites australis* apparaît supérieure, pour les trois métaux analysés, et plus particulièrement pour le cuivre, permettant d'éliminer jusqu'à 75 % de Zn, 71 % de Pb, 65 % de Cu (sans citrate) et 82 % de Zn, 76 % de Pb, 76 % de Cu (avec citrate) dans le sol au niveau des systèmes racinaires. La capacité apparemment supérieure du phragmite, par rapport à l'iris et au saule, pourrait être due à sa plus forte activité rhizosphérique. En effet, le sol au niveau du système racinaire du phragmite est 2.5 fois plus riche en carbone organique que les sols de l'iris et du saule, ce qui suggère une plus importante excrétion des composés organiques, et par conséquent, une plus forte activité biotique, puisque le carbone produit est la source majeure d'énergie pour les microorganismes. Par ailleurs, à la différence de l'iris et du saule, le phragmite est une graminée, qui exsude des phytosidérophores (acides aminés) ayant des capacités de complexation de Fe, Zn et Cu bien supérieures à celles d'autres exsudats racinaires tels que les acides carboxyliques ou phénoliques. La complexation des métaux avec des phytosidérophores pourrait également expliquer la capacité supérieure du phragmite, et son efficacité en remobilisation du cuivre. Le traitement complémentaire avec le citrate s'est avéré concluant dans la mesure qu'il a apporté, pour les trois plantes, un effet supplémentaire à l'effet combiné des plantes et de l'irrigation, en termes de remobilisation et de lixiviation des métaux du sol suivant l'ordre d'affinité : Cu > Zn > Pb, et qu'il n'a pas produit d'effet toxique apparent sur la production de la biomasse des plantes, leur croissance, et leur physiologie. L'effet du citrate apparaît plus prononcé pour le saule et l'iris que pour le phragmite. Il faut noter toutefois que le traitement au citrate a été effectué ponctuellement, durant un mois, dix mois avant la fin de l'expérience de la phytoremédiation. De fait, les différences observées à la fin de la phytoremédiation, entre les sols des espèces végétales pourraient être dues à d'autres facteurs tels que par exemple la croissance et la propagation des systèmes racinaires. Ceci pourrait expliquer le fait que, même sans traitement au citrate, le phragmite obtient les rendements importants de phytolixiviation, qui sont plus élevés que ceux obtenus avec l'iris et le saule avec traitement au citrate. Il en ressort donc que, parmi les espèces végétales testées, la graminée *Phragmites australis* semble être la plus appropriée à la phytolixiviation dans le dispositif des casiers. L'augmentation de la densité de plantation du phragmite jusqu'à 6 plantes/m², sans risque d'expansion excessive, permettrait probablement d'obtenir le rapport efficacité/coût de

traitement plus avantageux qu'avec un traitement complémentaire au citrate. En tenant compte de la configuration des casiers, et du fort potentiel d'expansion du système racinaire du phragmite, il est possible d'estimer, à titre de prévision approximative, à partir des taux d'extraction obtenus en seize mois dans le sol au niveau du système racinaire, que dans ce dispositif, environ deux années de traitement avec le phragmite seraient nécessaires pour abaisser les teneurs en métaux dans ce sol jusqu'à un seuil comparable avec des teneurs habituelles dans les sols agricoles français.

L'étude de la spéciation du zinc dans le sol après phytoremédiation, avec les micro-analyses, a permis d'identifier à l'échelle microscopique sept espèces du zinc : le zinc métallique (Zn^0), l'oxyde de zinc (ZnO), la gahnite (ZnAl_2O_4), la willémite (Zn_2SiO_4), la kérolite zincifère, la goethite zincifère, et le phosphate zincifère. A l'échelle macroscopique, les analyses EXAFS, couplées aux analyses chimiques, ont permis de quantifier ces espèces dans le volume de sols, et de mettre ainsi en évidence les changements de la spéciation du zinc induits par la phytoremédiation. Les résultats obtenus ont montré que le traitement avec les trois plantes produit un effet similaire sur la spéciation du zinc dans le sol. La spéciation résiduelle du zinc dans le sol après phytoremédiation est dominée par les trois espèces : le phosphate, la kérolite, et la goethite, en proportions relatives ~64 %, ~15 %, et ~14 %, respectivement, en moyenne pour les sols de trois plantes sans traitement au citrate, et ~56 %, ~18 %, et ~19 % avec traitement au citrate (avec une précision de ± 10 % du zinc total). Les quatre autres espèces : le zinc métallique, l'oxyde de zinc, la gahnite et la willémite, sont minoritaires dans le volume de sol. La phytoremédiation a induit les changements profonds de la spéciation du zinc, puisqu'une espèce initialement majoritaire (30 % du zinc initial), à savoir l'oxyhydroxyde de fer zincifère mal cristallisé (Zn-ferrihydrite), a été éliminée lors de la phytoremédiation (0 % du zinc restant). Parallèlement, une nouvelle espèce de l'oxyhydroxyde de fer zincifère bien cristallisé et plus stable (Zn-goethite), dans laquelle le zinc est incorporé dans le réseau cristallin, s'est formée. La transformation ferrihydrite-goethite et l'incorporation du zinc dans la structure de la goethite suggèrent la coprécipitation de Fe et Zn libérés en solution suite à la dissolution des phases porteuses initiales. Le bilan quantitatif des espèces du zinc dans le sol, en termes de quantités du zinc séquestré dans chacune des espèces, entre avant et après phytoremédiation, a permis de montrer que parmi les espèces zincifères initiales, la gahnite, la willémite, la kérolite et le phosphate ont persisté en quantités quasi constantes après phytoremédiation sans traitement au citrate, et la ferrihydrite a été totalement dissoute. Une partie de Zn libéré suite à la dissolution de la ferrihydrite a précipité dans le sol avec Fe en goethite zincifère, en faible quantité, et la majeure partie de Zn libéré a été éliminée du sol. Le traitement complémentaire au citrate a entraîné, en outre, la dissolution d'une partie de phosphate

zincifère, et ceci a été confirmé par la migration simultanée et ponctuelle de Zn et de P dans les lixiviats suite à l'ajout du citrate. Les micro-analyses à l'interface sol-racines ont mis en évidence la présence des formes nouvelles, et particulièrement originales du zinc, à savoir les particules du zinc métallique pur (Zn^0) accompagnées des particules du zinc métallique oxydé (Zn^0 -ZnO) et des particules de l'oxyde de zinc pur (ZnO), qui coexistent à l'échelle de quelques dizaines de micromètres dans le sol au niveau de la rhizosphère. La présence simultanée des particules métalliques pures et oxydées, qui sont par ailleurs de taille, de cristallinité, et de taux d'oxydation variables, suggère une forte hétérogénéité des conditions locales dans la rhizosphère, et pourrait témoigner des différentes voies d'évolution des particules métalliques du zinc en fonction des conditions locales. Le zinc natif dans des conditions naturelles n'a été que très rarement observé jusqu'ici, seulement dans quelques cas particuliers, dans l'environnement réducteur de gisements de minerai de cuivre et d'argent. La présence du zinc réduit sous forme de particules métalliques dans l'environnement de la rhizosphère globalement oxygénée, comme ceci est suggéré par la présence de la goethite et l'émission de l'oxygène par les racines de ces plantes de milieux humides, est *a priori* inattendue, mais pourtant avérée. L'origine des particules du zinc métallique dans ces conditions pourrait être biologique, provenant de la bioréduction par des substances bioorganiques produites par les racines de ces plantes et les microorganismes associés. Ces nouvelles formes du zinc, identifiées dans la rhizosphère, ne sont pas contenues en quantité significative dans le volume de sol, ce qui signifie que la séquestration du zinc dans ces phases serait marginale, et restreinte aux conditions locales de certaines zones de la rhizosphère.

D'après les résultats de l'étude de la spéciation du zinc dans le sol, le processus majeur induisant la remobilisation et la lixiviation du zinc lors de la phytoremédiation de ce sol, dans le dispositif des casiers, est la dissolution du pool de la ferrihydrite zincifère. Une faible quantité de Zn solubilisé de ce pool a été immobilisée dans le sol, par la précipitation en goethite zincifère, et la quantité majeure et importante a été éliminée du sol. La quantité du zinc initialement contenu dans le pool de la ferrihydrite éliminée correspond, avec la précision de la méthode, à la quantité du zinc lixivié du sol, estimée d'après les calculs du bilan de la phytoremédiation. Les mesures des paramètres physico-chimiques (Eh, pH) dans les lixiviats ont montré les fluctuations des conditions physico-chimiques globales dans les casiers entre hydromorphie-réduction et assèchement-oxydation au cours du traitement. Ces fluctuations sont similaires aux variations des conditions qui sont souvent observées dans des zones humides suivant les saisons. Les micro-analyses de la spéciation ont montré par ailleurs une forte hétérogénéité des conditions physico-chimiques locales dans le sol au niveau de la rhizosphère, à l'échelle de quelques dizaines de micromètres. Cette hétérogénéité des conditions dans les casiers, tant au niveau macroscopique qu'au niveau

microscopique, témoigne manifestement d'une forte activité redox du milieu, qui résulte de l'interaction de l'activité racinaire (respiration végétale et bactérienne, émission de l'oxygène, exsudation des composés organiques par les racines, etc.) avec les facteurs physico-chimiques du milieu dus à l'irrigation contrastée (inondation-anaérobie, drainage, assèchement-aérobie) produisant un effet synergique. Les mesures des concentrations des éléments dans les lixiviats ont montré les fronts de migration simultanée du zinc et du fer dans les lixiviats au cours du temps en fonction des conditions redox. Lors des périodes d'hydromorphie-réduction, les conditions réductrices sont favorables à la dissolution de la ferrihydrite, forme oxydée de fer, le fer et le zinc mis en solution migrent dans les lixiviats. Il est possible que le zinc migre dans les lixiviats également sous forme colloïdale ou particulaire, en association avec des oxyhydroxydes de fer, phyllosilicates ou autres phases, cependant les techniques de prélèvement et d'analyse des lixiviats, qui ont été utilisées dans ce travail, ne permettent pas de statuer sur ce point. Lors des périodes d'assèchement-oxydation, les conditions oxydantes s'installent dans les casiers, elles sont favorables à la précipitation de la goethite zincifère. Les micro-analyses de la spéciation à l'interface sol-racines ont montré par ailleurs que la goethite zincifère, en association avec la kérolite, forme des « plaques » à la surface des racines du phragmite, et que les précipités au voisinage des racines du phragmite et de l'iris contiennent également de la goethite. Le piégeage du zinc dans ces précipités pourrait être d'origine biologique, liée aux mécanismes de détoxification des plantes vis-à-vis de l'excès du zinc dissous et toxique.

L'étude de la spéciation du cuivre dans le sol a permis de montrer que, contrairement au zinc, qui est sous plusieurs formes minérales, le cuivre dans le sol initial avant phytoremédiation, est uniquement sous forme organique (~100 %), associé à des groupes carboxyliques de la matière organique. La phytoremédiation a induit la modification profonde de la spéciation du cuivre, puisque après seize mois, le sol contient ~77 % de cuivre organique et ~23 % de cuivre métallique (avec une précision de ± 10 % du cuivre total), en moyenne pour les sols de trois plantes, sans ou avec citrate. L'activité racinaire en conjonction avec l'irrigation (plus le citrate lorsqu'il est appliqué) a favorisé donc l'altération et la minéralisation de la matière organique porteuse du cuivre, avec la formation des particules du cuivre métallique. Le bilan quantitatif des espèces du cuivre dans le sol, en termes de quantités du cuivre contenu dans chacune des espèces, entre avant et après phytoremédiation, a montré qu'une quantité importante du cuivre, correspondant à environ 20 % de cuivre organique initial, a été transformée en cuivre métallique, et ainsi immobilisée dans le sol. L'immobilisation du cuivre, sous forme de particules métalliques, en quantité importante, explique sa plus faible lixiviation par rapport au zinc. L'étude détaillée de l'interface sol-racines de *Phragmites australis* et de *Iris pseudacorus*, à l'échelle

microscopique, par l'utilisation combinée de microscopie optique, μ SXRF, μ XRD et μ EXAFS en conjonction avec les calculs thermodynamiques, a permis de mettre en évidence que les nanoparticules du cuivre métallique sont d'origine biologique. Elles sont formées par les racines en association avec des champignons endomycorhizes. L'émission de l'oxygène dans le sol par les biais des aérénchymes et l'exsudation des composés organiques par les racines favorisent l'oxydation et la dissolution de la matière organique porteuse de Cu et donc la libération de Cu (II) en solution. Le cuivre cationique étant très phytotoxique, ces plantes adoptent les mécanismes de détoxification vis-à-vis de l'excès du cuivre cationique toxique et le transforment en cuivre métallique non toxique. L'iris adopte le mécanisme externe de détoxification en formant le cuivre métallique à l'extérieur des racines par le biais des champignons mycorhizes. Le phragmite forme le cuivre métallique également à l'extérieur des racines, mais aussi à l'intérieur des racines, et plus particulièrement dans les cellules du cortex. La formation du cuivre métallique dans la rhizosphère semble être un trait commun et caractéristique de ces plantes de milieux humides. La découverte de ce nouveau mode de biominéralisation du cuivre par les racines ouvre de nombreuses perspectives pour l'utilisation de ces plantes de milieux humides, par exemple, en phytostabilisation du cuivre, en phytomining du cuivre, en nanosynthèses du cuivre métallique, etc.

Pour résumer, il ressort des résultats de ce travail que la spéciation des métaux lourds, en particulier du zinc et du cuivre, dans le sol n'est pas une constante; elle évolue profondément sous l'influence de l'activité racinaire et des facteurs physico-chimiques du milieu; et ceci dans un laps de temps relativement court; en seize mois dans les conditions de cette expérimentation. L'adaptation vitale des racines des plantes de milieux humides aux changements des conditions physico-chimiques du milieu permet de créer l'environnement biochimiquement actif où les conditions locales au niveau de la rhizosphère peuvent être en contraste avec les conditions globales du milieu. Les interactions entre les racines, les microorganismes et le sol dans les conditions physico-chimiques imposées par l'irrigation contrôlent la transformation des métaux. La phytoremédiation de ce sol avec ces plantes de milieux humides a induit la remobilisation des métaux dans le sol et la lixiviation d'une partie des métaux, qui est importante pour le zinc et plus faible pour le cuivre, mais aussi a conduit l'immobilisation d'une partie des métaux, qui est importante pour le cuivre et plus faible pour le zinc, sous les nouvelles formes, moins solubles, moins disponibles et moins toxiques (particules métalliques et goethite zincifère). La formation de ces nouvelles phases est due, du moins pour une part, aux mécanismes de détoxification de ces plantes en réponse au stress provoqué par l'excès des métaux solubles et toxiques. Pour ce sol, la lixiviation importante du zinc est due à la remobilisation et la lixiviation du zinc de l'oxyhydroxyde de fer zincifère initialement majoritaire (ferrihydrite zincifère). La plus faible lixiviation du cuivre,

avec ces plantes de milieux humides, est due à l'immobilisation du cuivre dans la rhizosphère, par les racines en association avec des champignons mycorhizes, sous forme de particules métalliques, en quantité importante. Cette nouvelle approche de la phytoremédiation dans des casiers végétalisés par des plantes de milieux humides implique plusieurs mécanismes majeurs. C'est d'abord la **phytolixiviation** induisant la solubilisation des métaux dans le sol et la lixiviation, puis la **phytotransformation**, due pour une part à la **phytodétoxication**, conduisant la conversion des métaux toxiques en nouvelles formes peu solubles et peu toxiques.

En conclusion, les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'approche de la phytoremédiation dans des casiers végétalisés par des plantes de milieux humides selon le principe de Jardins Filtrants offre un bon potentiel pour la dépollution des sols contenant une pollution polymétallique. Par rapport aux techniques de phytoremédiation existantes, telles que la phytostabilisation et la phytoextraction, cette solution, désignée globalement par le terme **phytolixiviation**, ouvre une nouvelle voie pour la phytoremédiation. La mise en culture irriguée du sol avec des plantes de milieux humides dans le dispositif des casiers permet de recréer des écosystèmes biochimiquement actifs, à l'image de l'environnement des zones humides naturelles. Cette culture permet d'obtenir les fluctuations des conditions physico-chimiques du milieu entre les périodes d'hydromorphie-réduction et d'assèchement-oxydation. Ces plantes de milieux humides s'adaptent aussi bien au stress réducteur qu'au stress oxydant, en régulant la respiration et l'émission de l'oxygène dans la rhizosphère, et en adoptant des mécanismes de détoxication vis-à-vis de l'excès des métaux toxiques. Ces plantes produisent des biomasses importantes et accumulent peu de métaux dans leurs parties aériennes. Cette caractéristique, commune à ces types de plantes, présente un avantage considérable dans la mesure que, d'une part, elle permet de limiter le risque de transfert des métaux dans la chaîne alimentaire *via* herbivores, et d'autre part, elle offre un potentiel pour la réutilisation et la valorisation de la biomasse végétale. L'action combinée de ces plantes et de l'irrigation permet de remobiliser et de lixivier une fraction importante des métaux du sol dans une période de temps relativement court (ici seize mois). Les lixiviats, issus du sol et chargés en métaux, sont collectés, grâce au dispositif des drains, puis piégés dans un filtre en tourbe végétalisée, d'un volume réduit. D'après les essais sur ce site pilote, parmi les plantes testées, la graminée *Phragmites australis* apparaît la plus intéressante pour la phytolixiviation dans le dispositif des casiers, offrant un potentiel très élevé pour dépolluer le sol dans un temps relativement court. Le caractère envahissant du phragmite présente des risques potentiels de propagation de cette plante, ce qui limite l'intérêt de son utilisation en conditions de pleins champs, mais le dispositif étanche des casiers permet de réduire ces risques. Le traitement dans le dispositif des casiers végétalisés peut être

appliqué aux différents types de matrices contaminées (sols, sédiments, boues), puisque ces matrices contiennent souvent des phases porteuses des métaux sensibles aux variations redox (oxyhydroxydes de Fe et de Mn, sulfures, matière organique, etc.). Ces matrices sont complexes et hétérogènes, et les résultats obtenus pour un sol donné sont difficilement transposables à une autre matrice. Cependant, il est important de retenir que ce sont les formes des métaux (spéciation) qui déterminent leur mobilité, c'est-à-dire leur aptitude à passer en solution, et par conséquent leur capacité à traverser les barrières biologiques (biodisponibilité) et leur toxicité, en particulier pour les plantes et les microorganismes associés. Or la spéciation est contrôlée par les conditions du milieu, et les changements de ces conditions induits par la phytoremédiation entraînent la modification de la spéciation des métaux. Comme le montre cette étude, l'efficacité du traitement est conditionnée par la spéciation initiale des métaux dans le sol, et déterminée par l'évolution de la spéciation dans les conditions résultant de l'interaction des facteurs physico-chimiques et biologiques du traitement. Dans ce sol, et dans les conditions de cette expérimentation, parmi plusieurs formes du zinc, qui sont toutes minérales, l'oxyhydroxyde de fer zincifère, sensible aux conditions réductrices, est le plus facilement remobilisable. Le phosphate zincifère est le plus labile au contact du citrate. Bien que le cuivre, qui est sous une forme organique sensible aux conditions oxydantes, soit également remobilisé, du moins en partie, la transformation du cuivre organique en cuivre cationique augmente sa mobilité, mais aussi sa toxicité pour les plantes. En contrepartie, les plantes se défendent, en immobilisant le cuivre sous forme métallique insoluble, ce qui limite la lixiviation du cuivre, mais permet aux plantes de survivre.

A l'issue de ce travail, le projet de la phytoremédiation a conduit à la mise en œuvre d'un tout premier au monde **Centre de phytorestauration par phytolixiviation selon le procédé de Jardins Filtrants** des matrices polluées (sols, sédiments, boues, déchets, etc.). Ce centre de 104 hectares, appelé la « **Bioferme** » du fait de son statut d'exploitation agricole, a pour vocation la restauration des ressources et la production de nouvelles ressources (néosols et biomasse). Il est situé à La Brosse-Montceaux (77) en région Ile-de-France, et a été mis en service en octobre 2009.

Ainsi, ce travail s'inscrit dans ce contexte très appliqué de phytoremédiation avec les enjeux et les retombées industrielles réelles, bien que les avancées et les perspectives immédiates se situent également au niveau fondamental.

D'un point de vue méthodologique, plusieurs études pourraient compléter ce travail. Etant donné les objectifs de ce travail et les contraintes inhérentes au dispositif des casiers, ici le flux de la lixiviation a été estimé quantitativement d'après les mesures des métaux dans le sol et des métaux dans les plantes. Il serait intéressant de compléter ce travail, concentré principalement sur la phase solide du sol, par l'étude de la phase liquide, dans un dispositif optimisé et adapté au prélèvement direct et continu des lixiviats dans les drains. Cette étude permettrait, d'une part, de compléter les résultats obtenus à partir de la phase solide par une mesure directe du flux de la lixiviation, et d'autre part, de mieux comprendre les mécanismes de la lixiviation, en particulier, de savoir sous quelles formes les métaux migrent dans les lixiviats. Il serait également intéressant d'étudier la lixiviation des métaux avec ce mode d'irrigation contrastée dans un casier sans plantes afin d'évaluer la part de l'effet due aux facteurs physico-chimiques apportés par l'irrigation.

Cette étude n'a pas permis de conclure en toute certitude sur l'origine biologique des particules du zinc métallique et de l'oxyde de zinc dans le sol au niveau de la rhizosphère, bien qu'elle semble réaliste. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de la morphologie de ces particules et leur association avec la matière biologique. Ces deux critères, en plus du critère de taille des particules, semblent être nécessaires pour confirmer l'origine biologique. L'étude de ces particules sur les lames minces par microscopie électronique apporterait plus d'information sur leur nature. Il serait également intéressant d'étudier les précipités racinaires sur les racines séparées du sol, en couplant microscopie électronique, μ SXRF, μ XRD et μ EXAFS. La possibilité de la formation du zinc métallique par des substances bioorganiques produites par ces plantes de milieux humides, pourrait être vérifiée, par exemple, par la mise en contact de la biomasse sèche des racines en poudre avec le zinc en solution.

D'un point de vue d'applications potentielles, il serait intéressant d'approfondir les connaissances acquises quant au rôle de ces plantes de milieux humides et des microorganismes associés dans la formation des particules métalliques. En effet, la formation du cuivre métallique dans la rhizosphère de ces plantes a été mise en évidence dans cette étude. La formation du zinc métallique a été suggérée. D'autres éléments métalliques, plus facilement réductibles tels que Au, Ag, Hg, Se, Te, sont susceptibles d'être réduits à l'état métallique sous l'action des racines de ces plantes. Il serait particulièrement intéressant d'effectuer au laboratoire des essais de la bioréduction avec la biomasse racinaire sèche (morte) de ces plantes sous forme de poudre mise en contact avec des métaux en solution. Ces essais permettront de mieux comprendre les mécanismes de cette bioréduction, et en particulier de vérifier éventuellement si le processus de la réduction est bio-contrôlé et requérant de l'activité métabolique des plantes et/ou des microorganismes, ou

si la réduction est bio-induite, dans le sens où l'organisme vivant n'intervient pas directement, et la réduction peut se faire sur des tissus morts. Par ailleurs, ces essais sont particulièrement intéressants dans l'optique de la mise au point de nouvelles méthodes bio-induites de nanosynthèses de particules métalliques dans des conditions douces (à température ambiante et en solution).

La formation du cuivre métallique dans la rhizosphère des plantes utilisées dans ce travail semble être un trait commun et caractéristique de ces types de plantes de milieux humides, qui ouvre des perspectives à leur utilisation en phytostabilisation du cuivre et en phytomining du cuivre à partir des racines. Par ailleurs, la détoxification du cuivre par ces plantes au niveau des racines présente un avantage considérable quant à l'utilisation éventuelle de ces types de plantes en phytoextraction des sols pollués avec plusieurs métaux, y compris le cuivre. En effet, il est couramment observé pour la majorité des plantes utilisées en phytoextraction que la présence du cuivre dans le sol et sa phytotoxicité élevée limite significativement les rendements de phytoextraction d'autres métaux (Zn, Pb, Cd, etc.) des sols contenant une pollution polymétallique. De ce point de vue, l'utilisation de *Salix viminalis*, en particulier, ou d'autres variétés de *Salix*, pour la phytoextraction du zinc et du cadmium pourrait être particulièrement avantageuse. Il serait également intéressant de savoir si ce nouveau mode de biominéralisation du cuivre est généralisable à d'autres types de plantes de milieux humides, à des plantes terrestres, et à d'autres types de matrices. La présence du cuivre métallique dans la tourbe végétalisée avec *Phragmites australis*, issue du casier de piégeage de ce site pilote, a été démontrée, en particulier, dans la thèse de A. Matynia (2009). Le casier à tourbe concentre les lixiviats chargés en métaux dans un volume réduit. La tourbe et les racines des plantes de ce casier pourraient alors être recyclées en vue de récupération des éléments métalliques (phytomining). Le cuivre natif a été auparavant observé dans des milieux réducteurs de tourbières naturelles. Les marais sont généralement des milieux plus oxygénés selon les saisons. Ce mode de biominéralisation du cuivre par les racines des plantes avec la formation du cuivre métallique peut être courant dans des zones humides, peut également avoir lieu en présence de ces plantes de milieux humides dans des environnements terrestres oxygénés, et pourrait peut-être avoir lieu avec d'autres types de plantes dans des environnements oxygénés.

D'autres types d'études pourraient être envisagés en prolongement de ce travail, concentré principalement sur la phase solide du sol. Il serait intéressant d'étudier la spéciation du zinc et du cuivre dans les racines séparées du sol et dans les parties aériennes de ces plantes, afin de mieux comprendre les mécanismes de tolérance de ces plantes vis-à-vis des métaux. Il serait intéressant également d'étudier les exsudats racinaires

de ces plantes et leur rôle dans la remobilisation des métaux. De ce point de vue, la graminée *Phragmites australis* semble être particulièrement intéressante, puisque la rhizosphère de cette plante est très riche en carbone organique et efficace en termes de phytolixiviation des métaux. Bien qu'un certain nombre d'études ait permis d'établir le parallélisme entre l'exsudation des phytosidérophores par les racines de graminées et la mobilité et biodisponibilité des métaux lourds, en particulier du cuivre, leur rôle dans le prélèvement des métaux par la plante est encore mal connu. L'étude des composés organiques exsudés par le phragmite permettrait également d'identifier et de sélectionner des chélatants naturels en perspective de leur application en phytoextraction assistée par des chélatants et en phytolixiviation.

Un autre prolongement de ce travail, réalisé sur la matrice d'un sol, serait d'étudier l'évolution de la spéciation des métaux suite à la phytoremédiation avec cette approche appliquée à d'autres types de sols et à d'autres types de matrices solides telles que les sédiments et les boues. Ce travail a fait ressortir la remobilisation-immobilisation du zinc associé aux oxyhydroxydes de fer suivant les périodes hydromorphie-assèchement, pour ce type de sol et dans les conditions d'une irrigation artificielle par cycles. De nombreuses études ont montré le piégeage du zinc par des oxyhydroxydes de fer dans d'autres types de sols et dans des sédiments. Les variations redox similaires à celles obtenues dans les conditions de cette expérimentation peuvent facilement avoir lieu dans les conditions naturelles suivant les saisons, avec des périodes de fortes pluies en hivers et des périodes d'assèchement en été. Dans les sédiments, en conditions originelles, le zinc est très souvent et majoritairement présent sous forme de sulfures. Des études ont montré la remobilisation du zinc suite à l'oxydation des sulfures, après la mise en dépôt et aération des sédiments, favorisée par un couvert végétal, et la lixiviation et/ou le piégeage du zinc par d'autres phases (oxyhydroxydes de fer, phosphates) (Isaure et al., 2005; Panfili et al., 2005). Le piégeage du zinc est plus ou moins durable et dépend de la nature des phases porteuses. Le zinc repiéagé par les oxyhydroxydes de fer peut être relargué pendant les périodes hivernales de fortes pluies. Il a été observé alors en conditions de la mise en dépôt des sédiments que la lixiviation du zinc suit de façon cyclique les périodes estivales et hivernales. Il ressort donc de ces travaux qu'il existe une « cyclicité » de la solubilisation du zinc en fonctions des conditions redox (et en fonctions des saisons) lorsqu'il est associé aux oxyhydroxydes de fer et/ou aux sulfures. Ce comportement géochimique du zinc semble être généralisable à plusieurs types de matrices solides et aux conditions naturelles.

En outre, ce travail a porté préférentiellement sur le zinc et le cuivre. Or, il serait également intéressant d'étudier la phytoremédiation selon le procédé de Jardins Filtrants du

cadmium et de l'arsenic, qui sont des polluants potentiellement plus dangereux et plus toxiques que le zinc et le cuivre. Par ailleurs, du fait de la sensibilité des formes de l'arsenic aux conditions redox, le traitement de ce polluant par Jardins Filtrants pourrait être particulièrement intéressant.

Enfin, les enjeux et les avancées de ce projet de phytoremédiation s'inscrivent à plus long terme au niveau environnemental et économique. Avec l'exemple de la « **Bioferme** », ces travaux ouvrent une nouvelle voie pour la phytoremédiation. Tout d'abord, d'un point de vue technique, ces travaux offrent une nouvelle méthode de phytoremédiation, la phytolixiviation, enrichissant la gamme des méthodes de phytoremédiation disponibles actuellement telles que la phytostabilisation et la phytoextraction. Avec la mise en service de la « Bioferme », la phytolixiviation est d'ores et déjà portée jusqu'à l'échelle industrielle et généralisée pour l'application à plusieurs types de matrices polluées (sols, sédiments, boues, etc.) et à plusieurs types de polluants. Mais en plus, avec la mise au point de cette première « Bioferme », ces travaux permettent de définir les bases d'un modèle économique, qui ouvre une nouvelle voie stratégique pour le développement de la phytoremédiation à terme, d'un point de vue économique et environnemental, mais aussi une nouvelle vocation pour l'agriculture. Comme le montre cet exemple de la « Bioferme », et un besoin récurrent de nouvelles sources d'énergie, le développement de ce type de solutions végétales constitue une filière rentable et stratégique à long terme, dans une démarche de renouvellement des ressources naturelles. Cette solution de phytoremédiation permet, en effet, non seulement de traiter des matrices polluées, et de les valoriser, mais aussi de valoriser la biomasse végétale. En résumé, au lieu d'utiliser la plante pour extraire les polluants dans ses parties récoltables, il s'agit d'utiliser l'action de la plante pour traiter et valoriser la matrice, en laissant la biomasse récoltable saine et valorisable. Il en résulte, selon le type de matrice, un sol dépollué ou un compost réutilisable, et une biomasse valorisable, qui est en effet la matière première renouvelable (carbone végétal) pour l'énergie, la chimie et les matériaux. L'unité de cette première « Bioferme » de 104 ha, qui cultive et emploie plusieurs espèces végétales (iris, scirpes, joncs, carex, roseaux), permet de traiter jusqu'à 50000 t de déchets par an, et de produire 1600 t de compost et 15 t/ha de la biomasse végétale sèche par an. Cette « Bioferme » abrite par ailleurs une pépinière de près de 300 espèces végétales dédiées à la dépollution. Ce type de centres de phytorestauration permet d'organiser des boucles écologiques de ressources pour les sols et l'énergie grâce à la valorisation de la biomasse. Mais en plus, le développement de ce type de solutions végétales permettrait à terme de produire des biomasses qui pourront un jour payer ce service de dépollution dans les pays les plus démunis.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acar Y. B., Gale R. J. (1995) Electrokinetic remediation : basic and technology status. *J. Hazard. Mater.* 40, 117-137.
- Agassi M., Tarchitzky J., Keren R., Chen Y., Goldstein D., and Fizik E. (2003) Effects of prolonged irrigation with treated municipal effluent on runoff rate. *J. Environ. Qual.* 32, 1053-1057.
- Alcacio T. E., Hesterberg D., Chou J. W., Martin J. D., Beauchemin S., Sayers D. E. (2001) Molecular scale characteristics of Cu(II) bonding in goethite-humate complexes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1355-1366.
- Alloway B. J. (1995) *Heavy metals in soils*. Blackie academic & professional. London, UK.
- Anderson C. W. N., Brooks R. R., Stewart R. B., and Simcock R. (1998) Harvesting a crop of gold in plants. *Nature* 395, 553-554.
- Anderson C. W. N. (2000) *Practical aspects of phytoextraction*. PhD Thesis, Massey University, New Zealand.
- Anderson C. W. N. (2005) Biogeochemistry of gold : accepted theories and new opportunities. In *Trace and Ultratrace Elements in Plants and Soil* (ed. I. Shtangeeva), pp. 287-321. WIT press.
- Ankudinov A. L., Ravel B., Rehr J. J., Conradson S. D. (1998) Real space multiple scattering calculation of XANES. *Phys. Rev.* B58, 7565-7576.
- Armstrong J., Armstrong W., and Beckett P. M. (2002) Phragmites australis : Venturi- and humidity-induced pressure flows enhance rhizome aeration and rhizosphere oxidation. *New Phytol.* 120, 107-207.

- Armstrong W. (1979) Aeration in higher plants. In *Advances in Botanical Research*, Vol. 7 (ed. H. W. Woolhouse), pp. 225-332. Academic Press, London.
- Arru L., Rognoni S., Baroncini M., Bonatti P. M., Perata P. (2004) Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper rich solution. *Euphytica* 140, 33-38.
- Ascencio J. A., Mejia Y., Liu H. B., Angeles C., and Canizal G. (2003) Bioreduction synthesis of Eu-Au nanoparticles. *Langmuir* 19, 5882-5886.
- Ascencio J. A., Rodriguez-Monroy A. C., Liu H. B., and Canizal G. (2004) Synthesis and structure determination of ytterbium nanoparticles. *Chem. Lett.* 30, 1056-1060.
- Ascencio J. A., Rincon A. C., and Canizal G. (2005) Synthesis and theoretical analysis of samarium nanoparticles : perspectives in nuclear medicine. *J. Phys. Chem. B.* 109, 8806-8812.
- Baize D. (1997a) Detection of moderate contamination by trace metals in agricultural soils. *Analisis* 25, M29-M35.
- Baize D. (1997b) *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols*. INRA éditions.
- Baize D. (2000) Teneurs en métaux lourds dans les sols français. Résultats généraux du programme ASPITET. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 22, 39-54.
- Baize D., Lamy I., Van Oort F., Dère C., Chaussod R., Sappin-Didier V., Bermond A., Bourgeois S., Schmitt C., and Schwartz C. (2002) 100 years spreading of urban waste water on market-garden soils close to Paris (France) : subsequent impacts and hazards. *17th World Congress of Soil Science*, Bangkok, Thailand.
- Baker A. J. M. and Brooks R. R. (1989) Terrestrial Higher Plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.
- Baker A. J. M. and Walker P. L. (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In *Heavy Metal Tolerance in Plants : Evolutionary Aspects* (ed. A. J. Shaw), pp. 155-178. CRC Press, Boca Raton.
- Banerjee I. A., Yu L., Matsui H. (2003) Cu nanocrystal growth on peptide nanotubes by biomineralization : Size control of Cu nanocrystals by tuning peptide conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1000, 14678-14682.
- Bard A. J., Parsons R., and Jordan J. (1985) *Standard Potentials in Aqueous Solutions*. IUPAC (Marcel Dekker). New York, USA.
- Bartikyan P. M. (1966) Native lead and zinc in the rocks of Armenia. *Zap. Vses. Mineral. Obshch.* 95, 99-102.
- Bassi R., Prasher S. O., Simpson B. K. (2000). Extraction of metals from a contaminated sandy soil using citric acid. *Environ. Prog.* 19, 275-282.

- Battistuzzi G., Borsari M., Canters G. W., Loschi L., Righi F., Sola M. (1999) Redox thermodynamics of blue copper proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 501-506.
- Battke F., Ernst D., Halbach S. (2005) Ascorbate promotes emission of mercury vapour from plants. *Plant, Cell Environ.* 28, 1487-1495.
- Beniston M. (2004) The 2003 heat wave in Europe : A shape of things to come ? An analysis based on Swiss climatological data and model simulations. *Geophys. Res. Lett.* 31, L02202.
- Berti W. R. and Cunningham S. D. (2000) Phytostabilization of metals. In *Phytoremediation of Toxic Metals : Using Plants to Clean Up the Environment* (ed. I. Raskin and B. D. Ensley), pp. 71-88. John Wiley & Sons.
- Bethke C. M. (2002) *The Geochemist's Workbench®-v. 4.0*. University of Illinois.
- Blais J. F., Tyagy R. D., Auclair J. C. (1992) Bioleaching of metals from sewage sludge by sulfur-oxidizing bacteria. *J. Environ. Eng. ASCE* 118, 690-707.
- Blaylock M. J., Salt D. E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B. D., and Raskin Y. (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 31, 860-865.
- Blaylock M. J. (2000) Field demonstration of phytoremediation of lead contaminated soils. In *Phytoremediation of contaminated soil and water* (ed. N. Terry and G. Bañuelos), pp. 1-12. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- Blaylock M. J. and Huang J. W. (2000) Phytoextraction of metals. In *Phytoremediation of Toxic Metals : Using Plants to Clean Up the Environment* (ed. I. Raskin and B. D. Ensley), pp. 53-70. John Wiley & Sons.
- Boisson J., Mench M., Vangronsveld J., Ruttens A., Kopponen P., and De Koe T. (1999) Immobilization of trace metals and arsenic by different soil additives : evaluation by means of chemical extractions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30, 365-387.
- Bolton Jr. H., Li S. W., Workman D. J., Girvin D. C. (1993) Biodegradation of synthetic chelates in subsurface sediments from the southeast coastal plain. *J. Environ. Qual.* 22, 125-132.
- Bostick B. C., Hansel C. M., La Force M. J., and Fendorf S. (2001) Seasonal fluctuations in zinc speciation within a contaminated wetland. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3823-3829.
- Bourennane H., Dère C., Lamy I., Cornu S., Baize D., Van Oort F., and King D. (2006) Enhancing spatial estimates of metal pollutants in raw wastewater irrigated fields using a topsoil organic carbon map predicted from aerial photography. *Sci. Total Environ.* 361, 229-248.
- Boyle R. W. (1961) Native zinc at Keno Hill. *Can. Mineral.* 6, 692-694.
- Bradley R., Burt A. J., Read D. J. (1981) Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* 292, 335-337.

- Bradshaw A. D. (1996) Underlying principles of restoration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 3-9.
- Brix H. (1994) Function of macrophytes in constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 29, 71-78.
- Brooks R. R. (1998) Phytochemistry of hyperaccumulators. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals. Their role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral exploration and Phytomining* (ed. R. R. Brooks), pp. 15-53. Cab International, Wallingford, UK.
- Buatier M. D., Sobanska S., Elsass F. (2001) TEM-EDX investigation on Zn- and Pb-contaminated soils. *Appl. Geochem.* 16, 1165-1177.
- Buettner G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants : Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543.
- Buettner G. R., Jurkiewicz B. A. (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals : Combinations to avoid. *Radiat. Res.* 145, 532-541.
- Cairney J. W. G., Meharg A. A. (1999) Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities. *Environ. Poll.* 106, 169-182.
- Cairney J. W. G., Meharg A. A. (2003) Ericoid mycorrhiza : a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 735-740.
- Calmano W., Mangold S., and Welter E. (2001) An XAFS investigation of the artefacts caused by sequential extraction analyses of Pb-contaminated soils. *Fres. J. Anal. Chem.* 371, 823-830.
- Canizal G., Schabes-Retchkiman P. S., Pal U., Hong Bo Liu, and Ascencio J. A. (2006) Controlled synthesis of Zn⁰ nanoparticles by bioreduction. *Mater. Chem. Phys.* 97, 321-329.
- Carey F. A. and Sundberg R. J. (2007) *Advanced organic chemistry. Part A : Structure and mechanisms*. Springer.
- Chaney R. L., Angle R. S., Baker A. J. M., and Li Y. M. (1998) *Method for phytomining of nickel, cobalt and other metals from soil*. United States Patent 5711784.
- Charlet L. and Manceau A. (1993) Structure, formation, and reactivity of hydrous oxide particles : insights from X-ray absorption spectroscopy. In *Environmental Particles* (ed. J. Buffle and H. P. Van Leeuwen), pp. 117-164. Lewis Publishers.
- Chen H. and Cutright T. (2001) EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 45, 21-28.
- Chen Y. X., Lin Q., Luo Y. M., He Y. F., Zhen S. J., Yu Y. L., Tian G. M., and Wong M. H. (2003) The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere* 50, 807-811.
- Chisholm J. E., Jones G. C., Purvis O. W. (1987) Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Miner. Mag.* 51, 715-718.

- Clarke A. H. and Sillitoe R. H. (1970) Native zinc and α -Cu,Zn from mina Dulcinea De Llampos, Copiapó, Chile. *Am. Miner.* 55, 1019-1021.
- Clemens S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-486.
- Cline S. R., Reed B. R. (1995) Lead removal from soils via bench-scale soil washing techniques. *J. Environ. Eng. ASCE* 121, 700-705.
- Collins J. F. and Buol S. W. (1970) Effects of fluctuations in the Eh-pH environment of iron and/or manganese equilibria. *Soil Sci.* 110, 111-118.
- Cooper E. M., Sims J. T., Cunningham S. D., Huang J. W., and Berti W. R. (1999) Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 28, 1709-1719.
- Cornell R.M. (1988) The influence of some divalent cations on the transformation of ferrihydrite to more crystalline products. *Clay Minerals* 23, 329-332.
- Cornell R. M. and Schwertmann U. (1996) *The Irons Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH Publishers. New York.
- Cotter-Howells J. and Thornton L. (1991) Sources and pathways of environmental lead to children in a Derbyshire mining village. *Environ. Geochem. Health* 13, 127-135.
- Cotter-Howells J. and Caporn S. (1996) Remediation of contaminated land by formation of heavy metal phosphates. *Appl. Geochem.* 11, 335-342.
- Cotter-Howells J. D., Champness P. E., Charnock J. M. (1999) Mineralogy of lead-phosphorus grains in the roots of *Agrostis capillaris* L. by ATEM and EXAFS. *Mineral. Mag.* 63, 777-789.
- Cotter-Howells J. D., Champness P. E., Charnock J. M., Pattrick R. A. D. (1994) Identification of pyromorphite in mine-waste contaminated soils by ATEM and EXAFS. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 393-402.
- Cunningham S. D. and Berti W. R. (1993) The remediation of contaminated soils with green plants : An overview. *In Vitro Cell. Dev. B.* 29P, 207-212.
- Cunningham S. D. (1994) *Method of obtaining lead and organolead from contaminated media using metal accumulating plants*. United States Patent 5320663.
- Dähn R., Scheidegger A., Manceau A., Schlegel M. L., Baeyens B., Bradbury M. H., and Morales M. (2002) Neoformation of Ni phyllosilicate upon Ni uptake on montmorillonite : A kinetics study by powder and polarized extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 2335-2347.
- Darrah P. R. (1993) The rhizosphere and plant nutrition : a quantitative approach. *Plant Soil* 155/156, 1-20.
- Das A. K., Chakraborty R., Cervera M. L., and Delaguardia M. (1995) Metal speciation in solid matrices. *Talanta* 42, 1007-1030.

- Davies B. E. (1992) Inter-relationships between soil properties and the uptake of cadmium, copper, lead and zinc from contaminated soils by radish (*Raphanus sativus* L.). *Water, Air, Soil Pollut.* 63, 331-342.
- Davis J. A., Kent D. B. (1990) Surface complexation modeling in aqueous geochemistry. In *Reviews in Mineralogy and Geochemistry, vol. 23: Mineral Water Interface Geochemistry* (ed. M. F. Hochella and A. White), pp. 177-260. Mineralogical Society of America, Washington, DC.
- Deng H., Ye Z. H., Wong M. H. (2004) Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environ. Pollut.* 132, 29-40.
- Dère C., Cornu S., and Lamy I. (2006a) Factors affecting the three-dimensional distribution of exogenous zinc in a sandy Luvisol subjected to intensive irrigation with raw wastewaters. *Soil Use Manag.* 22, 289-297.
- Dère C., Lamy I., Van Oort F., Baize D., and Cornu S. (2006b) Reconstitution des apports en éléments traces métalliques et bilan de leur migration dans un Luvisol sableux soumis à 100 ans d'irrigation massive par des eaux usées brutes. *C. R. Geosci.* 338, 565-573.
- Dère C., Lamy I., Jaulin A., and Cornu S. (2007) Long-term fate of exogenous metals in a sandy Luvisol subjected to intensive irrigation with raw wastewater. *Environ. Pollut.* 145, 31-40.
- DiCicco A., Berrettoni M., Stizza S., Bonetti E., Cocco G. (1994) Microstructural defects in nanocrystalline iron probed by X-ray absorption spectroscopy. *Phys. Rev.* B50, 12386-12397.
- Dodge C. J., Francis A. J. (1994) Photodegradation of uranium–citrate complex with uranium recovery. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3062-3067.
- Dommergues Y. and Mangenot F. (1970) *Ecologie microbienne du sol*. Masson.
- Dufková V. (1984) EDTA in algal culture media. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67, 479-492.
- Dushenkov S. (2003) Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant Soil* 249, 167-175.
- Dushenkov V., Kumar N. P. B. A., Motto H., and Raskin I. (1995) Rhizofiltration : the use of plants to remove heavy metal from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.*, 1239-1245.
- Dzombak D. A., Morel M. M. F. (1990) *Surface Complexation Modelling*. John Wiley & Sons, New York.
- Ebbs S. D., Lasat M. M., Brady D. J., Cornish J., Gordon R., and Kochian L. V. (1997) Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 26, 1424-1430.

- Ebbs S. D. and Kochian L. V. (1998) Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. Technol.* 32, 802-806.
- Ebbs S. D., Norvell W. A., Kochian L. V. (1998) The effect of acidification and chelating agents on the solubilization of uranium from contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 27, 1486-1494.
- Egli M., Mirabella A., Sartori G., and Fitze P. (2003) Weathering rates as function of climate : results from a climosequence of the Val Geneva (Trentino, Italian Alps). *Geoderma* 11, 99-121.
- Egli T. (2001) Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 89-97.
- Elliott H. A., Brown G. A. (1989) Comparative evaluation of NTA and EDTA for extractive decontamination of Pb-polluted soils. *Water, Air, Soil Pollut.* 45, 361-369.
- Emerson D., Weiss J. V., and Megonigal J. P. (1999) Iron-oxidizing bacteria are associated with ferric hydroxide precipitates (Fe-plaque) on the roots of wetland plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2758-2761.
- Emerson D. (2000) Microbial oxidation of Fe(II) and Mn(II) at circumneutral pH. In *Environmental Metal-Microbe Interactions* (ed. D. R. Lovley), pp. 31-52. ASM Press, Washington, DC.
- EPA (2003) *National primary drinking water standards*. EPA Agency, EPA-816-F-03-016.
- EPA (2007) *Aquatic life ambient freshwater quality criteria - copper 2007 revision*. EPA Agency, EPA-822-F07-001.
- Epstein A. L., Gussman C. D., Blaylock M. J., Yermiyahu U., Huang J. W., Kapulnik Y., and Orser C. S. (1999) EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* 208, 87-94.
- Evangelou M. W. H., Ebel M., and Schaeffer A. (2007) Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68, 989-1003.
- Faulkner S. P. and Richardson C. J. (1989) Physical and chemical characteristic of freshwater wetland soils. In *Constructed Wetlands for Wastewater Treatment : Municipal, Industrial and Agricultural* (ed. D. A. Hammer), pp. 41-72. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA.
- Filimonova L. G. and Trubkin N. V. (2008) Micro- and nanoparticles of zincite and native zinc from disseminated mineralization of metasomatic rocks in the Dukat ore field. *Geology of Ore Deposits* 50, 135-144.
- Foster A. L., Brown G. E., Tingle T. N., Parks G. A. (1998) Quantitative arsenic speciation in mine tailings using X-ray absorption spectroscopy. *Am. Miner.* 83, 553-568.

- Francis A. J., Dodge C. J., Gillow J. B. (1992) Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility. *Nature* 356, 140-142.
- Frenkel A. I., Hills C. W., Nuzzo R. G. (2001) A view from the inside : Complexity in the atomic scale ordering of supported metal nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 105, 12689-12703.
- Frenkel A. I., Korshin G. V. (2001) Studies of Cu(II) in soil by X-ray absorption spectroscopy. *Canad. J. Soil Sci.* 81, 271-276.
- Fustec E. and Lefeuvre J. C. (2000) *Fonctions et valeurs des zones humides*. Dunod.
- Gadd G. M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25-60.
- Gadd G. M. (2007) Geomycology : biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111, 3-49.
- Gaad G. M. and Griffiths A. J. (1978) Microorganisms and heavy metal toxicity. *Mircobiol. Ecol.* 4, 303-317.
- Gaillard J. F., Webb S. M., Quintana J. P. G. (2001) Quick X-ray absorption spectroscopy for determining metal speciation in environmental samples. *J. Synchrotron Rad.* 8, 928-930.
- Gardea-Torresdey J. L., Tiemann K. J., Parsons J. G., Gamez G., Herrera I., Jose-Yacaman M. (2002) XAS investigations into the mechanism(s) of Au(III) binding and reduction by alfalfa biomass. *Microchem. J.* 71, 193-204.
- Gardea-Torresdey J. L., Parsons J. G., Gomez E., Peralta-Videa J., Troiani H. E., Santiago P., Yacaman M. J. (2002) Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett.* 4, 397-401.
- Gardea-Torresdey J. L., Gomez E., Peralta-Videa J. R., Parsons J. G., Troiani H. E., Yacaman M. J. (2003) Alfalfa sprouts : A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir* 19, 1357-1361.
- Gardiner J. (1976) Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters. *Water Res.* 10, 507-514.
- Ghestem J. P., Bermond A. (1998) EDTA extractability of trace metals in polluted soils : A chemical-physical study. *Environ. Technol.* 19, 409-416.
- Goncharova T. Y. (1959) On native metallic zinc. *Zap. Vses. Mineral. Obshch.* 88, 458-459.
- Gonzalez-Chavez C., D'Haen J., Vangronsveld J., Dodd J. C. (2002) Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240, 287-297.
- Grcman H., Velikonja-Bolta S., Vodnik D., Kos B., and Lestan D. (2001) EDTA enhanced heavy metal phytoextraction : metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant Soil* 235, 105-114.

- Grcman H., Vodnik D., Velikonja-Bolta S., Lestan D. (2003) Ethylenediaminedissuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced : Lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 32, 500-506.
- Greene B., Hosea M., McPherson R., Henzl M., Alexander M. D., Darnall D. W. (1986) Interaction of gold(I) and gold(III) complexes with algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* 20, 627-632.
- Gruebel K. A., Davis J. A., Leckie J. O. (1988) The feasibility of using sequential extraction techniques for arsenic and selenium in soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 390-397.
- Gupta S. K. and Chen K. Y. (1975) Partitioning of trace metals in selective chemical fractions of near shore sediments. *Environ. Lett.* 10, 129-158.
- Hall J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1-11.
- Hammer D. A. (ed.) (1989) *Constructed Wetlands for Wastewater Treatment : Municipal, Industrial, and Agricultural*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA.
- Hansel C. M., Fendorf S., Sutton S., and Newville M. (2001) Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impacted aquatic plants. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3863-3868.
- Hansel C. M., La Force M. J., Fendorf S., and Sutton S. (2002) Spatial and temporal association of As and Fe species on aquatic plant roots. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1988-1994.
- Harmsen J., Rulkens W. H., and Eijssackers H. J. P. (2005) Bioavailability : concept for understanding or tool for predicting ? *Land Contam. Reclam.* 13, 161-171.
- Haslam E. (1989) *Plant Polyphenols : Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge University Press.
- Haslam E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines : possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59, 205-215.
- Hauser L., Tandy S., Schulin R., and Nowack B. (2005) Column extraction of heavy metals from soils using the biodegradable chelating agent EDDS. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6819-6824.
- Heaton D. N., George G. N., Garrison G., Winge D. R. (2001) The mitochondrial copper metallochaperone cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex. *Biochemistry* 40, 743-751.
- Hering J. G., Stumm W. (1990) Oxidative and reductive dissolution of minerals. In *Mineral-Water Interface Geochemistry, Vol. 23* (ed. Hochella M. F. Jr. and White A. F.), pp. 427-465. Mineralogical Society of America. Washington, DC.

- Hesterberg D., Sayers D. E., Zhou W., Robarge W. P., Plummer G. M. (1997) XAFS characterization of copper in model aqueous systems of humic acid and illite. *J. Phys.* IV 7, 833-834.
- Hettiarachchi G. M., Pierzynski G. M., Ransom M. D. (2000) In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4614-4619.
- Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68, 139-146.
- Hinck M. L., Ferguson J. F., Puhakka J. A. (1997) Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation. *Water Sci. Technol.* 35, 25-31.
- Hinsinger P. (1998a) How do plant roots acquire mineral nutrients ? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* 64, 225-265.
- Hinsinger P. (1998b) Structure and function of the rhizosphere : mechanisms at the soil-root interface. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* 5, 340-341.
- Hinsinger P. (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In *Trace Elements in the Rhizosphere* (ed. G. R. Gobran, W. W. Wenzel, E. Lombi), pp. 25-41. CRC Press LCC, Boca Raton, Florida, USA.
- Hinsinger P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W. (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168, 293–303.
- Hochella M. F., Moore J. N., Golla U., Putnis A. (1999) A TEM study of samples from acid mine drainage systems: Metal–mineral association with implications for transport. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3395-3406.
- Holmes J. D., Richardson D. J., Saed S., Evans-Gowing R., Russel D. A., and Sodeau J. R. (1997) Cadmium-spécific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*. *Mircobiology* 143, 2521-2530.
- Horemans N., Foyer C. H., Potters G., Asard H. (2000) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 531-540.
- Horne A. J. (2000) Phytoremediation by constructed wetlands. In *Phytoremediation of contaminated soil and water* (ed. N. Terry and G. Bañuelos), pp. 13-39. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- Huang J. W., Chen J., Berti W. R., and Cunningham S. D. (1997) Phytoremediation of Lead-Contaminated Soils : Role of Synthetic Chelates in Lead Phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31, 800-805.
- Huang J. W. W., Blaylock M. J., Kapulnik Y., Ensley B. D. (1998) Phytoremediation of uranium contaminated soils : Role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2004-2008.

- Huffman D. L., O'Halloran T. V. (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 677-701.
- Hugenschmidt S., Planas-Bohne F., Taylor D. (1993) On the toxicity of low doses of tetrasodium-ethylenediaminetetraacetate (Na-EDTA) in normal rat kidney (NRK) cells in culture. *Arch. Toxicol.* 67, 76-78.
- Isaure M. P. (2002) *Spéciation et transfert du zinc dans un dépôt de sédiment de curage contaminé : évolution le long du profil pédologique. Thèse Université J. Fourier - Grenoble I.*
- Isaure M. P., Laboudigue A., Manceau A., Sarret G., Tiffreau C., Trocellier P., Lambelle G., Hazemann J. L., and Chateigner D. (2002) Quantitative Zn speciation in a contaminated dredged sediment by μ -PIXE, μ -SXRF, EXAFS spectroscopy and principal component analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 1549-1567.
- Isaure M. P., Manceau A., Geoffroy N., Laboudigue A., Tamura N., and Marcus M. A. (2005) Zn mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 1173-1198.
- Jackson L. J. (1998) Paradigms of metal accumulation in rooted aquatic vascular plants. *Sci. Total Environ.* 219, 223-231.
- Jacquet T. (2006) *Traitement de polluants par phytolixiviation*. Brevet international WO2006/030164.
- Jaillard B. (1985) Activité racinaire et rhizostructures en milieu carbonaté. *Pédologie* 35, 297-313.
- Jana N. R., Wang Z. L., Sau T. K., Pal T. (2000) Seed-mediated growth method to prepare cubic copper nanoparticles. *Curr. Sci.* 79, 1367-1370.
- Jenny H. (1980) *The soil resource*. Springer-Verlag. Berlin.
- Jerry D. A., Brown D. S., Novo-Gradac K. J. (1991) *MINTEQA2/PRODEFA2, a geochemical assesment model for environmental systems : User's manual, version 3.0, US EPA/600/3-91/021 Report*.
- Johnston J. H. and Lewis D. G. (1983) A detailed study of the transformation of ferrihydrite to hematite in an aqueous medium at 92°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 47, 1823-1831.
- Jones D. L. (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Juillot F., Morin G., Ildefonse P., Trainor T. P., Benedetti M., Galois L., Calas G., and Brown G. E. (2003) Occurrence of Zn/Al hydrotalcite in smelter-impacted soils from northern France : Evidence from EXAFS spectroscopy and chemical extractions. *Am. Miner.* 88, 509-526.

- Jungk A. O. (1991) Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. In *Plants roots. The hidden half* (ed. Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi), pp. 455-482. Marcel Dekker. New York.
- Juste C. (1988) Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Sciences du Sol* 26, 103-112.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M., Mocquot B., Feix I., Wiart J. (1995) *Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines*. Rapport INRA-ADEME.
- Kabata-Pendias A. and Pendias H. (1992) *Trace elements in soils and plants*. CRC Press LLC. Florida.
- Kawase M. and Whitmoyer R. E. (1980) Aerenchyma development in waterlogged plants. *Am. J. Bot.* 67, 18-22.
- Kayser A., Wenger K., Keller A., Attinger W., Felix H. R., Gupta S. K., and Schulin R. (2000) Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: The use of NTA and sulfur amendments. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1778-1783.
- Keeling S. M., Stewart R. B., Anderson C. W. N., and Robinson B. H. (2003) Nickel and cobalt phytoextraction by the hyperaccumulator *Berkheya coddii* : implications for polymetallic phytomining and phytoremediation. *Inter. J. Phytorem.* 5, 235-244.
- Kim C. S., Bloom N. S., Rytuba J. J., Brown G. E. (2003) Mercury speciation by X-ray absorption fine structure spectroscopy and sequential chemical extractions: A comparison of speciation methods. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5102-5108.
- Kirpichtchikova T., Manceau A., Spadini L., Panfili F., Marcus M. A., Jacquet T. (2006) Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 2163-2190.
- Khanbabae K. and Van Ree T. (2001) Tannins : classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 641-649.
- Kneebone P. E., O'Day P. A., Jones N., Hering J. G. (2002) Deposition and fate of arsenic in iron- and arsenic-enriched reservoir sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 381-386.
- Kodama H., Nelson S., Yang A. F., and Kohyama N. (1994) Mineralogy of rhizospheric and non-rhizospheric soils in corn fields. *Clays Clay Miner.* 42, 755-763.
- Komárek M., Tlustoš P., Száková J., Chrastný V., and Ettler V. (2007) The use of maize and poplar in chelant-enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soils. *Chemosphere* 67, 640-651.
- Komárek M., Tlustoš P., Száková J., and Chrastný V. (2008) The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environ. Pollut.* 151, 27-38.

- Korshin G. V., Frenkel A. I., Stern E. A. (1998) EXAFS study of the inner shell structure in copper (II) complexes with humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2699-2705.
- Kos B. and Lestan D. (2003) Induced phytoextraction/soil washing of lead using biodegradable chelate and permeable barriers. *Environ. Sci. Technol.* 37, 624-629.
- Kostka J. E., Luther G. W. (1994) Partitioning and speciation of solid phase iron in saltmarsh sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 1701-1710.
- Krämer U. (2005) Phytoremediation : novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 133-141.
- La Force M. J. and Fendorf S. (2000) Solid-phase iron characterization during common selective sequential extractions. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 64, 1608-1615.
- Labrenz M., Druschel G. K., Thomsen-Ebert T., Gilbert B., Welch S. A., Kemner K. M., Logan G. A., Summons R. E., De Stasio G., Bond P. L., Lai B., Kelly S. D., and Banfield J. F. (2000) Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Science* 290, 1744-1747.
- Labrenz M. and Banfield J. F. (2004) Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system. *Microbiol. Ecol.* 47, 205-217.
- Lake D. L., Kirk P. W., and Lester J. W. (1984) Fractionation, characterization and speciation of heavy metals in sewage sludge and sludge-amended soils : a review. *J. Environ. Qual.* 13, 175-183.
- Lamy I., Van Oort F., Dère C., and Baize D. (2006) Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 731-740.
- Lanson B., Marcus M. A., Fakra S., Panfili F., Geoffroy N., and Manceau A. (2008) Formation of Zn-Ca phyllomanganate nanoparticles in grass roots. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 2478-2490.
- Laperche V., Logan T. J., Gaddam P., and Triana S. J. (1997) Effects of apatite amendment on plant uptake of lead from contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2745-2753.
- Lasat M. M., Baker A. J. M., and Kochian L. V. (1998) Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 118, 875-883.
- Leyval C., Turnau K., Haselwandter K. (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Lidon F. C., Henriques F. S. (1994) Subcellular localization of copper and partial isolation of copper proteins in roots from rice plants exposed to excess copper. *Aust. J. Plant Physiol.* 21, 427-436.

- Lichtenegger H. C., Schoberl T., Bartl M. H., Waite H., Stucky G. D. (2002) High abrasion resistance with sparse mineralization : copper biomineral in worm jaws. *Science* 298, 389-392.
- Liénard A., Boutin C., Molle P., Racault Y., Brissaud F., and Picot B. (2004) Filtres plantés de roseaux à flux vertical et lagunage naturel en traitement d'eaux usées domestiques en France : comparaison des performances et des contraintes d'exploitation en terme de pérennité et fiabilité. *Ingénieries-EAT* n° spécial 2004, 87-99.
- Lindsay W. L. (1979) *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons. New York.
- Lindsay W. L., Vlek P. L. G., and Chien S. H. (1989) Phosphate minerals. In *Minerals in Soil Environment* (ed. J. B. Dixon and S. B. Weed), pp. 1089-1130. Soil Sci. Soc. Am., Madison.
- Linn J. H., Elliott H. A. (1988) Mobilization of Cu and Zn in contaminated soil by NTA. *Water, Air, Soil Pollut.* 37, 449-458.
- Liu D., Kottke I. (2004) Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Biores. Technol.* 94, 153-158.
- Lohmann M. (1992) *Guide complet de la nature*. Editions Chantecler. Aartselaar. Belgique.
- Lombi E., Zhao F. J., Dunham S. J., and McGrath S. P. (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils : Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30, 1919-1926.
- Lorenz S. E., Hamon R. E., and McGrath S. P. (1994) Differences between soil solutions obtained from rhizosphere and non-rhizosphere soils by water displacement and soil centrifugation. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 431-438.
- Loué A. (1993) *Oligoéléments en agriculture*, Nathan.
- Lovley D. R. (1993) Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 263-290.
- Luo C., Shen Z., Lou L., and Li X. (2006) EDDS and EDTA-enhanced phytoextraction of metals from artificially contaminated soil and residual effects of chelant compounds. *Environ. Pollut.* 144, 862-871.
- Luster J., Göttlein A., Nowack B., and Sarret G. (2008) Sampling, defining, characterising and modeling the rhizosphere - The soil science toolbox. *Plant Soil*, DOI 10.1007/s11104-008-9781-3.
- MacFarlane G. R., Burchett M. D. (2000) Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat. Bot.* 68, 45-59.
- Malinowski E. R. (1991) *Factor Analysis in Chemistry*. John Wiley, New York.
- Manceau A., Llorca S., Calas G. (1987) Crystal chemistry of cobalt and nickel in lithiophorite and asbolane from New Caledonia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 105-113.

- Manceau A., Boisset M. C., Sarret G., Hazemann J. L., Mench M., Cambier P., and Prost R. (1996) Direct determination of lead speciation in contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1540-1552.
- Manceau A., Chateigner D., Gates W. P. (1998) Polarized EXAFS, distance-valence least-squares modeling (DVLS) and quantitative texture analysis approaches to the structural refinement of Garfield nontronite. *Phys. Chem. Miner.* 25, 347-365.
- Manceau A., Schlegel M., Nagy K. L., Charlet L. (1999) Evidence for the formation of trioctahedral clay upon sorption of Co^{2+} on quartz. *J. Colloid Interf. Sci.* 220, 181-197.
- Manceau A., Lanson B., Schlegel M. L., Harge J. C., Musso M., Eybert Berard L., Hazemann J. L., Chateigner D., and Lambie G. M. (2000a) Quantitative Zn speciation in smelter-contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Am. J. Sci.* 300, 289-343.
- Manceau A., Schlegel M. L., Musso M., Sole V. A., Gauthier C., Petit D., and Trolard F. (2000b) Crystal chemistry of trace elements in natural and synthetic goethite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 3643-3661.
- Manceau A., Tamura N., Marcus M. A., MacDowell A. A., Celestre R. S., Sublett R. E., Sposito G., Padmore H. A. (2002a). Deciphering Ni sequestration in soil ferromanganese nodules by combining X-ray fluorescence, absorption and diffraction at micrometer scales of resolution. *Am. Miner.* 87, 1494-1499.
- Manceau A., Marcus M. A., Tamura N. (2002b) Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In *Reviews in Mineralogy and Geochemistry, vol. 49 : Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science* (ed. Fenter P., Rivers M., Sturchio N. C., Sutton S.), pp. 341-428. Mineralogical Society of America, Washington, DC.
- Manceau A., Lanson B., Drits V. A. (2002c) Structure of heavy metal sorbed birnessite. Part III : Results from powder and polarized EXAFS spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 2639-2663.
- Manceau A., Tamura N., Celestre R. S., MacDowell, A. A., Geoffroy N., Sposito G., Padmore H. A. (2003) Molecular-scale speciation of Zn and Ni in soil ferromanganese nodules from loess soils of the Mississippi basin. *Environ. Sci. Technol.* 37, 75-80.
- Manceau A., Marcus M. A., Tamura N., Proux O., Geoffroy N., and Lanson B. (2004) Natural speciation of Zn at the micrometer scale in a clayey soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 2467-2483.
- Manceau A., Tommaseo C., Rihs S., Geoffroy N., Chateigner D., Schlegel M., Tisserand D., Marcus M. A., Tamura, N. Chen Z. S. (2005) Natural speciation of Mn, Ni and Zn at the micrometer scale in a clayey paddy soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 4007-4034.

- Manceau A., Nagy K. L., Marcus M. A., Lanson M., Geoffroy N., Jacquet T., and Kirpichtchikova T. (2008) Formation of metallic copper nanoparticles at the soil-root interface. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1766-1771.
- Marcus M. A., MacDowell A. A., Celestre R., Manceau A., Miller T., Padmore, H. A., Sublett R.E. (2004) Beamline 10.3.2 at ALS : a hard X-ray microprobe for environmental and materials sciences. *J. Synchrotron Rad.* 11, 239-247.
- Marschner H. and Römheld V. (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165, 261-274.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. Second Edition, Academic Press.
- Martell A. E., Smith R. M., Motekaitis R. J. (2001) *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 6*. NIST, Gaithersburg, MD, USA.
- Martell A. E., Smith R. M. (2004) *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 8.0*. NIST, Gaithersburg, MD, USA.
- Mathys W. (1977) The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants. *Physiologia Plantarum* 40, 130-136.
- Matynia A. (2009) *Mécanisme de rétention du cuivre sur de la tourbe végétalisée*. Thèse Université Grenoble I.
- Mc Bride M. B. (1989) Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Adv. Soil Sci.* 10, 1-56.
- Mc Carthy P. and O'Conneide S. (1974) Fulvic acids. II. Interaction with metal ions. *J. Soil Sci.* 25, 429-437.
- Mc Laughlin M. J., Smolders E., and Merckx R. (1998) Soil-root interface : Physico-chemical processes. In *Soil Chemistry and Ecosystem Health* (ed. P. M. Huang), pp. 233-277. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- McCabe O. M., Baldwin J. L., and Otte M. L. (2001) Metal tolerance in wetland plants ? *Minerva Biotechnologica* 13, 141-149.
- McGrath S. P. (1998) Phytoextraction for soil remediation. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals. Their role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral exploration and Phytomining* (ed. R. R. Brooks), pp. 261-287. Cab International, Wallingford, UK.
- Meharg A. A. (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol. Res.* 107, 1253-1265.
- Mejare M. and Bulow L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 19, 67-73.
- Mench M., Morel J. L., Guckert A., and Guillet B. (1988) Metal binding with root exudates of low molecular weight. *J. Soil Sci.* 39, 521-527.

- Mench M. (1990) Transfert des oligo-éléments du sol à la racine et absorption. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 76, 17-30.
- Mench M. J. and Fargues S. (1994a) Metal uptake by iron-efficient and inefficient oats. *Plant Soil* 165, 227-233.
- Mench M., Vangronsveld J., Didier V., and Clijsters H. (1994b) Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environ. Pollut.* 86, 279-286.
- Mench M., Bussiere S., Boisson J., Castaing E., Vangronsveld J., Ruttens A., De Koe T., Bleeker P., Assuncao A., and Manceau A. (2003) Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in situ treatments. *Plant Soil* 249, 187-202.
- Moffat A. J., Armstrong A. T., and Ockleston J. (2001) The optimization of sewage sludge and effluent disposal on energy crops of short rotation hybrid poplar. *Biomass Bioener.* 20, 161-169.
- Molle P., Liénard A., Boutin C., Merlin G., and Iwema A. (2004) Traitement des eaux usées domestiques par marais artificiels : état de l'art et performances des filtres plantés de roseaux en France. *Ingénieries-EAT* n° spécial 2004, 23-32.
- Monson C. F., Woolley A. T. (2003) DNA-templated construction of copper nanowires. *Nano Lett.* 3, 359-363.
- Moreau J. W., Webb R. I., and Banfield J. F. (2004) Ultrastructure, aggregation-state, and crystal growth of biogenic nanocrystalline sphalerite and wurtzite. *Am. Miner.* 89, 950-960.
- Moreau J. W., Weber P. K., Martin M. C., Gilbert B., Hutcheon I. D., and Banfield J. F. (2007) Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles. *Science* 316, 1600-1603.
- Morin G., Ostergren J. D., Juillot F., Ildefonse P., Calas G., Brown G. E. (1999) XAFS determination of the chemical form of lead in smelter-contaminated soils and mine tailings: Importance of adsorption processes. *Am. Miner.* 84, 420-434.
- Morin G., Juillot F., Ildefonse P., Calas G., Samama J.C., Chevallier P., Brown, G.E. (2001) Mineralogy of lead in a soil developed on a Pb-mineralized sandstone (Largentière, France). *Am. Miner.* 86, 92-104.
- Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D., Senapati S., Sainkar S. R., Khan M. I., Parishcha R., Ajaykumar P. V., Alam M., Kumar R., Sastry M. (2001) Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix : A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* 1, 515-519.

- Mukherjee P., Senapati S., Mandal D., Ahmad A., Khan M. I., Kumar R., and Sastry M. (2002) Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem. Biol.* 3, 461-463.
- Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F. (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater : an evaluation. *Eng. Geol.* 60, 193-207.
- Murray K. and Linder P. W. (1984) Fulvic acids : structure and metal binding. II. Predominant metal binding sites. *J. Soil Sci.* 35, 217-222.
- Nachtegaal N., Marcus M. A., Sonke J. E., Vangronsveld J., Livi K., Van der Lelie D., Sparks D.L. (2005) Effects of in situ remediation on the speciation and bioavailability of zinc in a smelter contaminated soil. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 4649-4664.
- Ni C. Y., Chen Y. X., Lin Q., Tian G. M. (2005) Subcellular localization of copper in tolerant and non-tolerant plant. *J. Environ. Sci. China* 17, 452-456.
- Norvell W. A. (1984) Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1285-1292.
- Nowack B., Xue H., Sigg L. (1997) Influence of natural and anthropogenic ligands on metal transport during infiltration of river water to groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 31, 866-872.
- Nriagu J. O. (1984) Formation and stability of base metal phosphates in soils and sediments. In *Phosphate Minerals* (ed. J. O. Nriagu and P. B. Moore), pp. 318-329. Springer Verlag, New York.
- O'Day P. A., Carroll S. A., Waychunas G. A. (1998) Rock-water interactions controlling zinc, cadmium, and lead concentrations in surface waters and sediments, US Tri-State Mining District. 1. Molecular identification using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 32, 943-955.
- O'Day P. A., Carroll S. A., Randall S., Martinelli R. E., Anderson S. L., Jelinski J., Knezovich, J. P. (2000) Metal speciation and bioavailability in contaminated estuary sediments, Alameda Naval Air Station, California. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3665-3673.
- OJEC (1998) On the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Communities* L-330 (5 December 1998).
- Oliveira R. S., Dodd J. C., Castro P. M. L. (2001) The mycorrhizal status of *Phragmites australis* in several polluted soils and sediments of an industrialised region of Northern Portugal. *Mycorrhiza* 10, 241-247.
- Ostergren J. D., Brown G. E., Parks G. A., and Tingle T. N. (1999) Quantitative speciation of lead in selected mine tailings from Leadville, CO. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1627-1636.
- Otte M. L., Rozema J., Koster M. S., Haarsma M. S., and Broekman R. A. (1989) Iron plaque on roots of *Aster tripolium* L. : interaction with zinc uptake. *New Phytol.* 11, 309-317.

- Otte M. L., Matthews D. J., Jacob D. L., Moran B. M., Baker A. J. M. (2004) Biogeochemistry of metals in the rhizosphere of wetland plants. An explanation for 'innate' metal tolerance. In *Developments in Ecosystems* (ed. M. H. Wong). Elsevier.
- Oviedo C., Rodriguez J. (2003) EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. *Quim. Nova* 26, 901-905.
- Paige C. R., Snodgrass W. J., Nicholson R. V., Scharer J. M., and He Q. H. (1997) The effect of phosphate on the transformation of ferrihydrite into crystalline products in alkaline media. *Water, Air, Soil Pollut.* 97, 397-412.
- Paktunc D., Foster A. L., Laflamme G. (2003) Speciation and characterization of arsenic in Ketza river mine tailings using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2067-2074.
- Paktunc D., Foster A., Heald S., Laflamme G. (2004) Speciation and characterization of arsenic in gold ores and cyanidation tailings using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 969-983.
- Panfil F. (2004) *Etude de l'évolution de la spéciation du zinc dans la phase solide d'un sédiment de curage contaminé, induit par phytostabilisation. Thèse Université de Provence - Aix-Marseille I.*
- Panfil F., Manceau A., Sarret G., Spadini L., Kirpichtchikova T., Bert V., Laboudigue A., Marcus M. A., Ahamdach N., and Libert M. F. (2005) The effect of phytostabilisation on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy and principal component analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 2265-2284.
- Parkhurst D. L., Appelo C. A. J. (1999) *User's Guide to PHREEQC (Version 2). A Computer Program for Speciation, Batch-reaction, One- Dimensional Transport, and Inverse Geochemical Calculations. US Geological Survey Water-Resources Investigations Report 99-4259.*
- Peters R. W. (1999) Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 66, 151-210.
- Peverly J. H., Surface J. M., Wang T. (1995) Growth and trace metal absorption by *Phragmites australis* in wetlands constructed for landfill leachate treatment. *Ecol. Eng.* 5, 21-35.
- Polette L. A., Gardea-Torresdey J. L., Chianelli R. R., George G. N., Pickering I. J., Arenas J. (1998) XAS and microscopy studies of the uptake and bio-transformation of copper in *Larrea tridentata* (creosote bush). *Microchem. J.* 65, 227-236.
- Proux O., Nassif V., Prat A., Ulrich O., Lahera E., Biquard X., Menthonnex J. J., Hazemann J. L. (2006) Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator : design and performances. *J. Synchrotron Radiat.* 13, 59-68.

- Ramade F. (1993) *Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement*. Edition Edisciences International.
- Raskin I., Kumar N. P. B., and Dushenkov S. (1994a) *Phytoremediation of metals*. United States Patent 5364451.
- Raskin I., Kumar N. P. B. A., Dushenkov S., and Salt D. E. (1994b) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 285-290.
- Raskin I. (1996) Plant genetic engineering may help with environmental clean-up. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93, 3164-3166.
- Raskin I., Smith R. D., and Salt D. E. (1997) Phytoremediation of metals : using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 221-226.
- Raskin I., Kumar N. P. B., and Dushenkov S. (1998) *Phytoremediation of metals*. United States Patent 5785735.
- Reeves R., Schwartz C., Morel J. L., and Edmondson J. (2001) Distribution and metal-accumulating behaviour of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. *Inter. J. Phytorem.* 3, 145-172.
- Regmi T., Banerji S. K., Hong A. (1996) Biodegradation of chelating agents used for metal removal from contaminated soils. In *HSRC/WERC Joint Conference on the Environment*, May 21-23, Albuquerque, NM.
- Ressler T., Wong J., Roos J., and Smith I. (2000) Quantitative speciation of Mn-bearing particulates emitted from autos burning (methylcyclopentadienyl) manganese tricarbonyl-added gasolines using XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 34, 950-958.
- Rivière J. L. (1998) *Evaluation du risque écologique des sols pollués*. Edition Lavoisier.
- Roberts D. R., Scheinost A. C., Sparks D. L. (2002) Zinc speciation in a smelter-contaminated soil profile using bulk and microspectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1742-1750.
- Roberts D., Scheinost A. C., and Sparks D. L. (2003) Zinc speciation in contaminated soils combining direct and indirect characterization methods. In *Geochemical and Hydrological Reactivity of Heavy Metals in Soils* (ed. H. M. Selim and W. L. Kingery), pp. 187-227. CRC Press.
- Robinson B. H., Brooks R. R., Howes A. W., Kirkman J. H., and Gregg P. E. H. (1997) The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *J. Geochem. Explor.* 60, 115-126.
- Robinson B. H., Leblanc M., Petit D., Brooks R. R., Kirkman J. H., and Gregg P. E. H. (1998) The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant Soil* 203, 47-56.

- Robinson B. H., Brooks R. R., and Clothier B. E. (1999) Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: Potential use for phytomining and phytoremediation. *Ann. Bot.* 84, 689-694.
- Robinson B. H., Mills T. M., Petit D., Fung L. E., Green S. R., and Clothier B. E. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant Soil* 227, 301-306.
- Rock S. A. (2003) Field evaluations of phytotechnologies. In *Phytoremediation. Transformation and Control of Contaminants* (ed. S. C. McCutcheon and J. L. Schnoor), pp. 905-924. John Wiley & Sons, NJ.
- Römkens P., Bouwman L., Japenga J., and Draaisma C. (2002) Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environ. Pollut.* 116, 109-121.
- Ryan J. A., Zhang P., Hesterberg D. A., Chou J., Sayers D. E. (2001) Formation of chloropyromorphite in lead-contaminated soil amended with hydroxyapatite. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3798-3803.
- Salt D. E., Blaylock M. J., Kumar N. P. B. A., Dushenkov S., Ensley B. D., Chet I., and Raskin I. (1995) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13, 468-474.
- Salt D. E., Smith R. D., and Raskin I. (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Phys.* 49, 643-668.
- Salt D. E., Prince R. C., Baker A. J. M., Raskin I., and Pickering I. J. (1999) Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33, 713-717.
- Sarret G., Manceau A., Spadini L., Roux J. C., Hazemann J. L., Soldo Y., Eybert Berard L., Menthonnex J. J. (1998) Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell walls by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1648-1655.
- Sarret G., Vangronsveld J., Manceau A., Musso M., D'Haen J., Menthonnex J. J., Hazemann J. L. (2001) Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2854-2859.
- Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J. L., Traverse A., Marcus M. A., Manceau A. (2002) Forms of Zn accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* 130, 1815-1826.
- Sarret G., Balesdent J., Bouziri L., Garnier J. M., Marcus M. A., Geoffroy N., Panfili F., and Manceau A. (2004) Zn speciation in the organic horizon of a contaminated soil by micro-x-ray fluorescence, micro- and powder-EXAFS spectroscopy, and isotopic dilution. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2792-2801.

- Satroutdinov A. D., Dedyukhina E. G., Chistyakova T. I., Witschel M., Minkevich I. G., Eroshin V. K., Egli T. (2000) Degradation of metal–EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1715-1720.
- Savage K. S., Tingle T. N., O'Day P. A., Waychunas G. A., Bird D. K. (2000) Arsenic speciation in pyrite and secondary weathering phases, Mother Lode Gold District, Tuolumne County, California. *Appl. Geochem.* 15, 1219-1244.
- Schabes-Retchkiman P. S., Canizal G., Herrera-Becerra R., Zorrilla C., Liu H. B., and Ascencio J. A. (2006) Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Opt. Mater.* 29, 95-99.
- Schafer F. Q., Buettner G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol. Med.* 30, 1191-1212.
- Schär C., Vidale P. L., Lüthi D., Frei C., Häberli C., Liniger M. A., Appenzeller C. (2004) The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature* 427, 332-336.
- Scheinost A. C., Kretzschmar R., Pfister S. (2002) Combining selective sequential extractions, X-ray absorption spectroscopy, and principal component analysis for quantitative zinc speciation in soil. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5021-5028.
- Schlegel M. L., Manceau A., Charlet L. (1997) EXAFS study of Zn and ZnEDTA sorption at the goethite (α -FeOOH)/water interface. *J. Phys. IV* 7, 823-824.
- Schlegel M. L., Manceau A., Charlet L., Hazemann J. L. (2001a) Adsorption mechanisms of Zn on hectorite as a function of time, pH, and ionic strength. *Am. J. Sci.* 301, 798-830.
- Schlegel M. L., Manceau A., Charlet L., Chateigner D., Hazemann J. L. (2001b) Sorption of metal ions on clay minerals. III. Nucleation and epitaxial growth of Zn phyllosilicate on the edges of hectorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 4155-4170.
- Schmitt-Sirguez C. (2004) *Dynamique du Cd disponible du sol sous l'influence de l'hyperaccumulateur Thlaspi caerulescens. Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL).*
- Schützendübel A., Polle A. (2002) Plant responses to abiotic stresses : heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351-1365.
- Schwartz C. (1997) *Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice Thlaspi caerulescens. Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL).*
- Schwartz C., Morel J. L., Saumier S., Whiting S. N., and Baker A. J. M. (1999) Root architecture of the zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant Soil* 208, 103-115.

- Schwartz C., Gerard E., Perronnet K., and Morel J. L. (2001) Measurement of in situ phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former smelter site. *Sci. Total Environ.* 279, 215-221.
- Schwartz C., Echevarria G., and Morel J. L. (2003) Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249, 27-35.
- Schwartz C., Sirguy C., Perrony S., Reeves R. D., Bourgaud F., and Morel J. L. (2006) Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. *Inter. J. Phytorem.* 8, 339-357.
- Schwertmann U. and Murad E. (1983) Effect of pH on the formation of goethite and hematite from ferrihydrite. *Clays Clay Miner.* 31, 277-284.
- Shotyk W. (1988) Review of the inorganic geochemistry of peats and peatland waters. *Earth Sci. Rev.* 25, 95-176.
- Shuman L. M. (1988) Effect of organic matter on the distribution of manganese, copper, iron and zinc in soil fractions. *Soil Sci.* 146, 192-198.
- Singh B., Gilkes R. J. (1996) Nature and properties of iron rich glaebules and mottles from some south-west Australian soils. *Geoderma* 71, 95-120.
- Singh S., Saxena R., Pandey K., Bhatt K., Sinha S. (2004) Response of antioxidants in sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on different amendments of tannery sludge : its metal accumulation potential. *Chemosphere* 57, 1663-1673.
- Slocik J. M., Moore J. T., Wright D. W. (2002) Monoclonal antibody recognition of histidine-rich peptide encapsulated nanoclusters. *Nano Lett.* 2, 169-173.
- Slocik J. M., Wright D. W. (2003) Biomimetic mineralization of noble metal nanoclusters. *Biomacromolecules* 4, 1135-1141.
- Smith R. M., Martell A. E. (1976) *Critical Stability Constants, vol. 4. Inorganic Complexes*. Plenum Press, New York and London.
- Smith R. M., Martell A. E. (1989) *Critical Stability Constants, vol. 3. Other Organic Ligands*. Plenum Press, New York.
- Smolders E., Lambregts R. M., McLaughlin M. J., and Tiller K. G. (1998) Effect of soil solution chloride on cadmium availability to Swiss chard. *J. Environ. Qual.* 27, 426-431.
- Sobolev D. and Roden E. E. (2002) Evidence for rapid microscale bacterial redox cycling of iron in circumneutral environments. *Anton. van Leeuw.* 81, 587-597.
- Song J., Zhao F. J., Luo Y. M., McGrath S. P., Zhang H. Z. (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 128, 307-315.

- Soon Y. K. and Bates T. E. (1982) Chemical pools of cadmium, nickel, and zinc in polluted soils and some preliminary indications of their availability to plants. *J. Soil Sci.* 33, 477-488.
- Soulier A., Regeard A., Trolard F. (1994) Calibration of selective extraction technique by citrate–bicarbonate on the basis of experimental dissolution of synthetic iron oxides. *Proc. 15th World Cong. Soil Sci.*, 3b-II. Mexican Society of Soil Science, Acapulco, Mexico, pp. 216-217.
- Southam G., Beveridge T. J. (1994) The in vitro formation of placer gold by bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 4527- 4530.
- Spadini L., Manceau A., Schindler P. W., Charlet L. (1994) Structure and stability of Cd^{2+} surface complexes on ferric oxides. *J. Colloid Interf. Sci.* 168, 73-86.
- Steele M. C., Pichtel J. (1998) Ex-situ remediation of a metal-contaminated Superfund soil using selective extractants. *J. Environ. Eng. ASCE* 124, 639-645.
- St-Cyr L. and Campbell P. G. C. (2000) Bioavailability of sediment-bound metals for *Vallisneria americana* Michx, a submerged aquatic plant, in the St. Lawrence River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1330-1341.
- Stoltz E., Greger M. (2002) Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 47, 271-280.
- Straub K. L. and Schink B. (2004) Ferrihydrite reduction by *Geobacter* species is stimulated by secondary bacteria. *Arch. Microbiol.* 182, 175-181.
- Strawn D. G., Sparks D. L. (2000) Effects of soil organic matter on the kinetics and mechanisms of Pb(II) sorption and desorption in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 144-156.
- Strawn D., Doner H., Zavarin M., McHugo S. (2002) Microscale investigation into the geochemistry of arsenic, selenium and iron in soil developed in pyritic shale materials. *Geoderma* 108, 237-257.
- Sun B., Zhao F. J., Lombi E., McGrath S. P. (2001) Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environ. Pollut.* 113, 111-120.
- Sun H. and Pan X. (2004) Microstructure of ZnO shell on Zn nanoparticles. *J. Mater. Res.* 19, 3062-3067.
- Sutton S. R., Rivers M. L., Chien S. H. (1999) Hard X-ray synchrotron microprobe techniques and applications. In *Synchrotron X-ray Methods in Clay Science* (ed. D. Schulze, P. Bertsch, J. Stucki), pp. 146-163. The Clay Minerals Society of America.
- Sutton S. R., Bertsch P. M., Newville M., Rivers M., Lanzirotti A., Eng P. (2002) Microfluorescence and microtomography analyses of heterogeneous earth and environmental materials. In *Applications of Synchrotron Radiation in Low-*

- Temperature Geochemistry and Environmental Science*, vol. 49. (ed. Fenter P. A., Rivers M. L., Sturchio N. C., Sutton S. R.), pp. 429-478. Mineralogical Society of America.
- Takahashi Y., Minamikawa R., Hattori K. H., Kurishima K., Kihou N., and Yuita K. (2004) Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded and non-flooded periods. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1038-1044.
- Tandy S., Bossart K., Mueller R., Ritschel J., Hauser L., Schulin R., Nowack B. (2004) Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 38, 937-944.
- Teo B. K. (1986) *EXAFS : Basic Principles and Data Analysis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Terry N., Carlson C., Raab T., and Zayed A. (1992) Rate of selenium volatilisation among crop species. *J. Environ. Qual.* 21, 341-344.
- Terry N., Pilon-Smits E., and Zhu Y. L. (2003) *Heavy metal phytoremediation*. United States Patent 6576816.
- Tessier A., Campbell P. G. C., and Bisson M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844-851.
- Thayalakumaran T., Robinson B. H., Vogeler I., Scotter D. R., Clothier B. E., and Percival H. J. (2003a) Plant uptake and leaching of copper during EDTA-enhanced phytoremediation of repacked and undisturbed soil. *Plant Soil* 254, 415-423.
- Thayalakumaran T., Vogeler I., Scotter D. R., Percival H. J., Robinson B. H., and Clothier B. E. (2003b) Leaching of copper from contaminated soil following the application of EDTA. I. Repacked soil experiments and a model. *Aust. J. Soil Res.* 41, 323-333.
- Thayalakumaran T., Vogeler I., Scotter D. R., Percival H. J., Robinson B. H., and Clothier B. E. (2003c) Leaching of copper from contaminated soil following the application of EDTA. II. Intact core experiments and model testing. *Aust. J. Soil Res.* 41, 335-350.
- Thiry M. and Van Oort F. (1999) Les phases minérales majeures et mineures d'une friche industrielle de métallurgie des métaux non-ferreux : Etat d'altération, évolution géochimique et devenir des métaux polluants du site de Mortagne-du-Nord. In *Spéciation des métaux dans le sol*, pp. 108-135. Publications Ecrin, Paris.
- Thiry M., Huet Taillanter S., Schmitt J. M. (2002) The industrial waste land of Mortagne-du-Nord (59)-I-Assessment, composition of the slags, hydrochemistry, hydrology and estimate of the outfluxes. *Bull. Soc. Geol. Fr.* 173, 369-381.
- Thorntor I. (1999) Bioavailability of trace elements in the food chain. *Proceedings of the 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, 11-15th July, Vienna, Austria.
- Tichy R., Rulkens W. H., Grotenhuis J. T. C., Nydl V., Cuypers C., Fajtl J. (1998) Bioleaching of metals from soils or sediments. *Water Sci. Technol.* 37, 119-127.

- Tonin C., Vandenkoornhuysen P., Joner E. J., Straczek J., Leyval C. (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10, 161-168.
- Treeby M., Marschner H., and Römheld V. (1989) Mobilization of iron and other micro-nutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant Soil* 114, 217-226.
- Trivedi P., Dyer J. A., Sparks D. L., Pandya K. (2004) Mechanistic and thermodynamic interpretations of zinc sorption onto ferrihydrite. *J. Colloid Interf. Sci.* 270, 77-85.
- Trolard F., Bourrie G., Jeanroy E., Herbillon A. J., Martin H. (1995) Trace metals in natural iron oxides from laterites: A study using selective kinetic extraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1285-1297.
- Turgut C., Pepe M. K., and Cutright T. J. (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environ. Pollut.* 131, 147-154.
- Van Benschoten J. E., Matsumoto M. R., Young W. H. (1997) Evaluation and analysis of soil washing for seven lead-contaminated soils. *J. Environ. Eng. ASCE* 123, 217-224.
- Vandevivere P., Hammes F., Verstraete W., Feijtel T., Schowanek D. (2001a) Metal decontamination of soil, sediment, and sewage sludge by means of transition metal chelant [S,S]-EDDS. *J. Environ. Eng. ASCE* 127, 802-811.
- Vandevivere P. C., Saveyn H., Verstraete W., Feijtel T. C. J., Schowanek D. R. (2001b) Biodegradation of metal-[S,S]-EDDS complexes. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1765-1770.
- Vangronsveld J., Van Assche F., and Clijsters H. (1995) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals : in situ immobilisation and revegetation. *Environ. Pollut.* 87, 51-59.
- Van Hoof N. A. L. M., Hassinen V. H., Hakvoort H. W. J., Ballintijn K. F., Schat H., Verkleij J. A. C., Ernst W. H. O, Karenlampi S. O, Tervahauta A. I. (2001) Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* 126, 1519-1526.
- Vassil A. D., Kapulnik Y., Raskin I., and Salt D. E. (1998) The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol.* 117, 447-453.
- Vassilev A., Schwitzguébel J. P., Thewys T., Van der Lelie D., Vangronsveld J. (2004) The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Sci. World J.* 4, 9-34.
- Védry B. (1996) *Balade écologique au fil de la Seine en 1900*. Editions Graphein.

- Védry B., Gousailles M., Affholder M., Lefaux A., and Bontoux J. (2001) From sewage water treatment to wastewater reuse. One century of Paris sewage farms history. *Water Sci. Technol.* 43, 101-107.
- Vesk P. A., Nockolds C. E., Allaway W. G. (1999) Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. *Plant, Cell Environ.* 22, 149–158.
- Viets F. G. (1962) Chemistry and availability of micronutrients. *J. Agric. Food Chem.* 10, 174-178.
- Villalobos M., Toner B., Barger J., and Sposito G. (2003) Characterization of the manganese oxides produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2649-2662.
- Viviani G. and Iovino M. (2004) Wastewater reuse effects on soil hydraulic conductivity. *J. Irrigat. Drain. Eng.* 130, 476-484.
- Voegelin A., Pfister S., Scheinost A. C., Marcus M. A., Kretzschmar R. (2005) Changes in zinc speciation in field soil after contamination with zinc oxide. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6616-6623.
- Walton B. T. and Anderson T. A. (1992) Plant-microbe treatment systems for toxic waste. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 267-270.
- Wasay S. A., Barrington S. F., Tokunaga S. (1998) Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *Environ. Technol.* 19, 369-379.
- Wasserman S. R. (1997) The analysis of mixtures : Application of principal component analysis to XAS spectra. *J. Phys. IV* 7, 203-205.
- Wasserman S. R., Allen P. G., Shun D. K., Bucher J. J., and Edelstein N. M. (1999) EXAFS and principal component analysis : a new shell game. *J. Synchrotron Rad.* 6, 284-286.
- Waychunas G. A., Fuller C. C., Davis J. A. (2002) Surface complexation and precipitate geometry for aqueous Zn(II) sorption on ferrihydrite I : X-ray absorption extended fine structure spectroscopy analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2649-2662.
- Weis J. S., Weis P. (2004) Metal uptake, transport and release by wetland plants : Implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Inter.* 30, 685-700.
- Weiss J. V., Emerson D., Backer S. M., and Megonigal J. P. (2003) Enumeration of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing bacteria in the root zone of wetland plants : Implication for a rhizosphere iron cycle. *Biogeochemistry* 64, 77-96.
- Wenzel W. W., Unterbrunner R., Sommer P., and Sacco P. (2003) Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant Soil* 249, 83-96.

- Whitburn J. S., Wilkinson S. D., Williams D. R. (1999) Chemical speciation of ethylenediamine–*N,N'*-disuccinic acid (EDDS) and its metal complexes in solution. *Chem. Spec. Bioavailab.* 11, 85-93.
- White A., Handler P., Smith E. L. (1973) *Principles of Biochemistry*, 5th ed. New York, McGraw-Hill.
- Wolery T. (1992) EQ3/6. *A Software Package for Geochemical Modelling of Aqueous Systems: Package Overview and Installation Guide (Version 7.0). Technical Report UCRL-MA-110662 PT.* Lawrence Livermore National Laboratory, USA.
- Wu J., Hsu F. C., and Cunningham S. D. (1999) Chelate-assisted Pb phytoextraction : Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1898-1904.
- Wu L. H., Luo Y. M., Xing X. R., and Christie P. (2004) EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agric. Ecosyst. Environ.* 102, 307-318.
- Xia K., Bleam W., Helmke P. A. (1997a) Studies of the nature of Cu²⁺ and Pb²⁺ binding sites in soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 2211-2221.
- Xia K., Bleam W., Helmke P. A. (1997b) Studies of the nature of binding sites of first row transition elements bound to aquatic and soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 2223-2235.
- Ye Z. H., Baker A. J. M., Wong M. H., and Willis A. J. (1998) Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. *Aquat. Bot.* 61, 55-67.
- Ye Z. H., Baker A. J. M., Wong M. H., and Willis A. J. (2003) Copper tolerance, uptake and accumulation by *Phragmites australis*. *Chemosphere* 50, 795-800.
- Zabinsky S. I., Rehr J. J., Ankudinov A., Albers R. C., Eller M. J. (1995) Multiple scattering calculations of X-ray absorption spectra. *Phys. Rev. B* 52, 2995-3009.

ANNEXE. Spectroscopie EXAFS, micro-EXAFS et micro-fluorescence X sur rayonnement synchrotron

1. LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON

Le rayonnement synchrotron est une radiation électromagnétique émise par des électrons relativistes accélérés dans un champ magnétique à des vitesses proches de celle de la lumière. La radiation est très intense et présente un spectre continu 'blanc' allant de l'infrarouge lointain aux rayons γ . Ce type de rayonnement tient une place prépondérante dans de nombreux domaines scientifiques, grâce d'une part à sa très large distribution spectrale (depuis le proche infrarouge jusqu'aux rayons X durs, à savoir de quelques eV à 10^5 eV) et d'autre part à l'intensité du flux de photons délivré, notamment avec les synchrotrons de 3^{ème} génération (ESRF, ALS). Pour exemple, les synchrotrons de 1^{ère} génération permettent l'obtention d'un flux de l'ordre de 10^{12} - 10^{13} photon/s/mm²/mrad², ceux de 2^{ème} génération de l'ordre de 10^{14} - 10^{15} photon/s/ μ m²/mrad² et ceux de 3^{ème} génération de 10^{19} - 10^{21} photon/s/ μ m²/mrad², comparé à un flux de l'ordre de 10^8 photon/s/ μ m²/mrad² pour les tubes à rayons X classiques. Les électrons produits et accélérés sont introduits dans l'anneau de stockage maintenu sous vide. Le rayonnement est émis au niveau des aimants de courbures ou des éléments d'insertion (onduleurs ou wigglers). Les onduleurs (composés d'une centaine d'aimants alignés de part et d'autre du faisceau) délivrent un faisceau d'une très grande brillance mais dans un domaine d'énergie restreinte, et les wigglers (comprenant

moins de pôles magnétiques que les onduleurs) sont utilisés pour produire un flux élevé sur une large gamme spectrale. Chaque source de lumière est caractérisée par son énergie critique d'émission et son flux de photons en fonction de l'énergie. Ces paramètres dépendent de l'énergie des électrons dans l'anneau (6 GeV à l'ESRF, correspondant au domaine d'étude des rayons X durs, 1.9 GeV à l'ALS et 1.85 GeV à DCI du LURE, correspondant à des domaines d'énergie des ultra-violets et rayons X mous). Par exemple, à l'ESRF, pour une énergie de 6 GeV et une intensité de 100 mA, un onduleur permet d'obtenir un flux de photons de l'ordre de 10^{18} ph/s/0.1%. Le flux tombe entre 10^{12} et 10^{14} pour un simple aimant de courbure.

Nos expériences sur rayonnement synchrotron ont été effectuées à l'ESRF (Grenoble) et à l'ALS (Berkeley).

2. LA SPECTROSCOPIE EXAFS

Cette partie consacrée à la spectroscopie EXAFS a pour objectif de donner les éléments nécessaires pour comprendre le principe et la mise en œuvre de cette méthode. Pour de plus amples informations, on pourra se reporter aux ouvrages spécialisés (Teo, 1986).

2.1. PRINCIPE

La spectroscopie d'absorption des rayons X est basée sur l'interaction des rayons X avec la matière. La méthode consiste à mesurer l'absorbance μx de l'échantillon étudié en fonction de l'énergie du rayonnement incident. En mode transmission, μx est définie par la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 \exp(-\mu x)$. I_0 et I représentent respectivement l'intensité du faisceau incident et l'intensité du faisceau transmis, x l'épaisseur de l'échantillon, μ le coefficient d'absorption linéaire.

Plusieurs régions sont à considérer dans un spectre d'absorbance (Figure A-3.1) :

- la première région se caractérise par une décroissance monotone de l'absorbance en fonction de l'énergie croissante des rayons X. L'énergie incidente est alors inférieure à

l'énergie de liaison des électrons de cœur de l'atome cible et les rayons X ne sont donc pas absorbés par l'atome cible.

- la deuxième région se caractérise par une augmentation brutale de l'absorbance, à une valeur d'énergie donnée appelée seuil d'absorption. La valeur E_0 de l'énergie du seuil d'absorption dépend de la nature de l'atome étudié. A cette valeur, l'énergie incidente est égale à l'énergie de liaison des électrons de cœur de l'atome étudié. Avant que l'énergie incidente n'atteigne E_0 , l'électron passe de son état fondamental à un état excité situé au dessous du seuil de l'énergie de Fermi. L'analyse de cette zone du spectre fournit des informations sur la structure électronique de l'atome étudié. Lorsque l'énergie incidente atteint E_0 , l'électron de cœur est éjecté vers le continuum. A des valeurs d'énergies de $E_0 + 50$ eV, l'énergie cinétique du photoélectron éjecté est faible et son libre parcours moyen est grand (plusieurs dizaines d'angströms). L'onde associée sonde alors un large domaine spatial, et il peut se produire des phénomènes de diffusion multiple avec les atomes voisins. Cette région autour de l'énergie de seuil est appelé XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure).

- la troisième région spectrale se caractérise par des oscillations de l'absorbance. Cette région s'étend de $E_0 + 50$ eV à $E_0 + 1000$ eV. A ces énergies, l'énergie cinétique du photoélectron éjecté est suffisante pour qu'il soit considéré comme libre et son libre parcours moyen est de ce fait limité. L'onde sonde un faible domaine spatial autour de l'atome absorbeur ($\sim 3-4$ Å). Dans le cas d'un gaz monoatomique, l'atome est isolé et, après seuil, l'absorbance décroît de façon monotone. En revanche, dans le cas d'un composé, la sphère de coordination de l'atome cible contient d'autres atomes : l'onde associée au photoélectron éjecté est rétrodiffusée par ces atomes voisins et interfère avec l'onde émergente, donnant lieu à des oscillations de l'absorbance dites oscillations EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure). L'étude de ces oscillations fournit des informations structurales sur l'environnement local de l'élément étudié, i.e. la distance, la nature, le nombre des atomes entourant l'atome absorbeur. Il est donc possible d'étudier des composés amorphes ou mal cristallisés. En outre, la technique est spécifique à un élément cible donné, ce qui en fait une sonde structurale locale et chimiquement sélective.

C'est cette région EXAFS que nous avons utilisée pour accéder à la spéciation du zinc et du cuivre dans les divers échantillons étudiés.

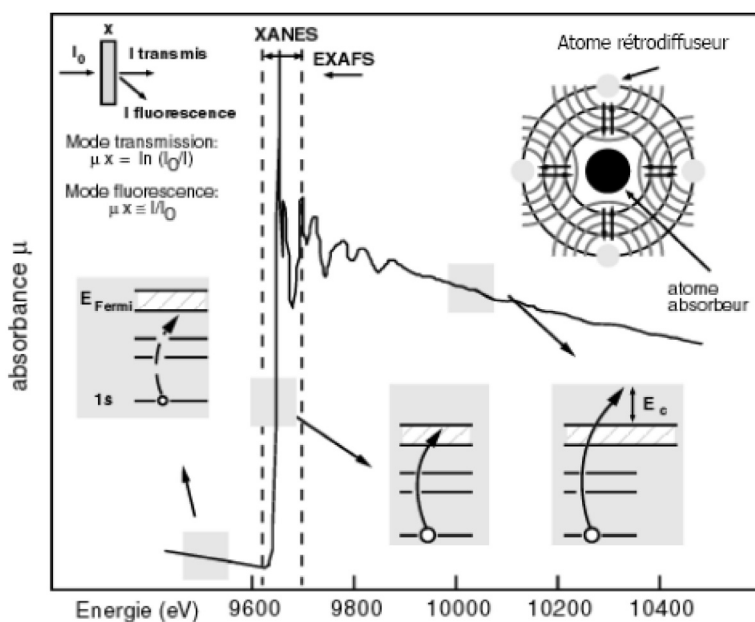


Figure A-3.1. Principe physique de la spectroscopie d'absorption des rayons X, exemple d'un spectre au seuil K du zinc.

2.2. FORMULATION DU SIGNAL EXAFS

Le signal EXAFS représente la somme de toutes les contributions des atomes voisins de l'atome cible. On peut le définir comme une somme de sinusoïdes amorties, chacune d'elles étant associée à une couche atomique entourant l'atome absorbant. L'équation EXAFS peut s'écrire :

$$\chi(k) = -S_0^2 \sum_i \frac{N_i}{k R_i^2} |\phi_i(\pi, k)| e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{\frac{-2R_i}{\lambda(k)}} \sin[2kR_i + \phi_i(k) + 2\delta_c(k)]$$

avec k vecteur d'onde, $k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2} (h\nu - E_0)}$, où m_e est la masse d'électron, $h\nu$ l'énergie du photon incident et E_0 l'énergie d'ionisation de l'élément absorbant, $\hbar = h/2\pi$, avec h constante de Planck.

S_0^2 : facteur d'échelle, terme de réduction d'amplitude dû aux effets multi-électroniques.

N_i : nombre de voisins de type i situés à la distance R_i de l'atome absorbant.

R_i : longueur effective du chemin i .

$|\phi_i(\pi, k)|$: amplitude de rétrodiffusion de l'atome de type i .

σ_i : facteur de Debye-Waller dans l'approximation d'une distribution gaussienne. Il comprend un terme de désordre statique (distribution des distances) et dynamique (agitation thermique).

λ : libre parcours moyen de l'électron. Il comprend les processus de diffusion inélastique du photo-électron par les électrons de valence.

$\delta_c(k)$: fonction de déphasage de l'atome central.

$\phi_i(k)$: fonction de déphasage de l'atome rétrodiffuseur.

Le terme sinus correspond à la composante oscillante. Il comprend un terme lié à la distance interatomique (R_i) et deux termes électroniques liés à la nature des atomes (ϕ_i et δ_c). La fréquence des oscillations dépend donc de la distance interatomique et de la nature des atomes. Le terme d'amplitude dépend du nombre de voisins (N_i) et du numéro atomique des atomes rétrodiffuseurs dans la couche i (ϕ_i).

L'équation EXAFS est basée sur plusieurs approximations :

- la transition est de nature dipolaire,
- l'électron éjecté est d'un niveau s,
- les fonctions d'onde de l'électron (dans l'état initial et dans l'état final) sont mono-électroniques, i.e. seul le photo-électron éjecté du niveau 1s participe au processus d'absorption (pas d'interaction entre les électrons),
- le potentiel des atomes est de symétrie sphérique,
- l'onde sortante est sphérique,
- la distribution des distances est harmonique et suit une distribution gaussienne,
- l'interaction entre le photo-électron éjecté et l'atome voisin est une diffusion simple ie le trajet du photo-électron est un aller-retour entre l'absorbeur et le rétrodiffuseur. Cette approximation est valable pour des valeurs de k supérieures à 3-4 Å (libre parcours moyen limité) et pour les premières couches atomiques. Dans les autres cas, la diffusion multiple doit généralement être prise en compte.

2.3. EXTRACTION DE SPECTRE EXAFS ET ANALYSE DES DONNEES

Le traitement des données EXAFS consiste à extraire au mieux les oscillations du spectre d'absorption qui traduisent les variations du coefficient d'absorption de l'atome cible dans l'échantillon étudié (Figure A-3.2). L'absorbance mesurée lors de l'expérience contient

une composante liée à l'absorption de la matrice (μ_0) et une autre liée à l'atome absorbeur (μ_1) dont il faut s'affranchir pour obtenir le signal EXAFS. On obtient la relation :

$$\chi = \frac{\mu - \mu_0}{\mu_1 - \mu_0},$$

μ_0 après seuil est déterminée en extrapolant l'absorption mesurée avant seuil par une fonction polynomiale, μ_1 est déterminée à l'aide d'une fonction spline. Afin de comparer les spectres entre eux, E_0 doit être déterminé de façon identique pour chaque spectre et est déterminé à la mi-hauteur du saut d'absorption.

Le spectre est représenté dans l'espace de k en convertissant $\chi(E)$ en $\chi(k)$ par la relation :

$$k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2} (h\nu - E_0)}.$$

Le terme $\exp(-2\sigma_i^2 k^2)$ dans l'équation EXAFS entraîne un amortissement du spectre vers les grandes valeurs de k et l'on atténue cet effet en pondérant le spectre $\chi(k)$ par k^n . Pour donner un poids important à cette zone, on choisit $n = 3$. La transformée de Fourier de la fonction $k^3\chi(k)$ permet de passer de l'espace réciproque en \AA^{-1} à l'espace réel en \AA . Cependant, le domaine $k^3\chi(k)$ est borné alors que le domaine d'intégration s'étend de 0 à $+\infty$: les effets des bornes entraînent l'apparition de lobes sur le modules de la transformée de Fourier qui n'ont pas de signification structurale. Pour atténuer ces lobes sans affecter l'amplitude des pics, on pondère $k^3\chi(k)$ par une fenêtre d'apodisation de type Kaiser dont les paramètres (bornes, τ) sont judicieusement choisis. On obtient alors une fonction de distribution radiale (FDR), module des parties réelle et imaginaire de la TF, sur laquelle les contributions des différentes couches atomiques autour de l'atome absorbeur apparaissent sous forme de pics à différentes distances. Cette FDR permet donc de visualiser la distribution des couches atomiques autour de l'atome cible mais les distances visualisées sont légèrement décalées par rapport aux distances réelles du fait des termes de déphasages φ_i et δ_c présents dans la fonction sinus de l'équation EXAFS et non corrigés lors de la TF. Ce décalage est fonction de la distance et de la nature de chaque voisin mais on peut estimer que les distances apparentes sont plus courtes que les distances réelles d'environ 0.3-0.4 \AA .

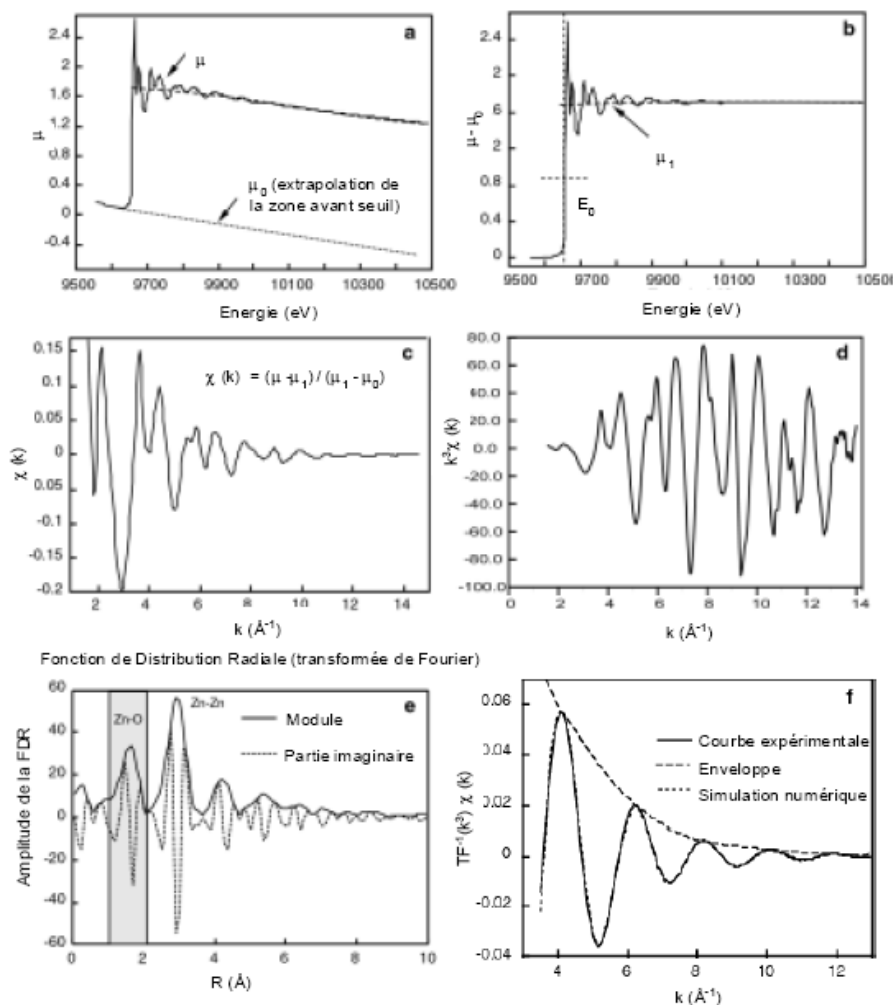


Figure A-3.2. Etapes de l'extraction et de l'analyse des données.

2.4. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET DETECTION DU SIGNAL

Une ligne de lumière est classiquement composée d'un monochromateur (double cristal de silicium) qui permet, à partir du faisceau blanc, de sélectionner une longueur d'onde selon la loi de Bragg, d'un ou plusieurs miroirs servant à rejeter les longueurs d'onde harmoniques, de fentes verticales et horizontales servant à collimater le faisceau, d'un détecteur I_0 et d'un détecteur I . L'intensité du faisceau monochromatique I_0 est mesurée en amont de l'échantillon par une chambre à ionisation ou une diode. En mode transmission, le détecteur mesurant I , situé en aval de l'échantillon, est également une chambre à ionisation ou une diode. En mode fluorescence, c'est un photo-multiplicateur ou d'un détecteur résolu en énergie, positionné à 45° de l'échantillon, qui mesure l'intensité de fluorescence I_1 (Figure A-3.3).

Nos expériences en EXAFS ont été réalisées sur la ligne FAME de L'ESRF, située à la sortie d'un aimant de courbure. Sur cette ligne, un miroir situé en amont du monochromateur focalise le faisceau verticalement, et un courbeur sur le second cristal du monochromateur le focalise sagittalement. En mode transmission, le détecteur est une diode, en mode fluorescence, il s'agit d'un détecteur multi-éléments au germanium résolu en énergie (Canberra).

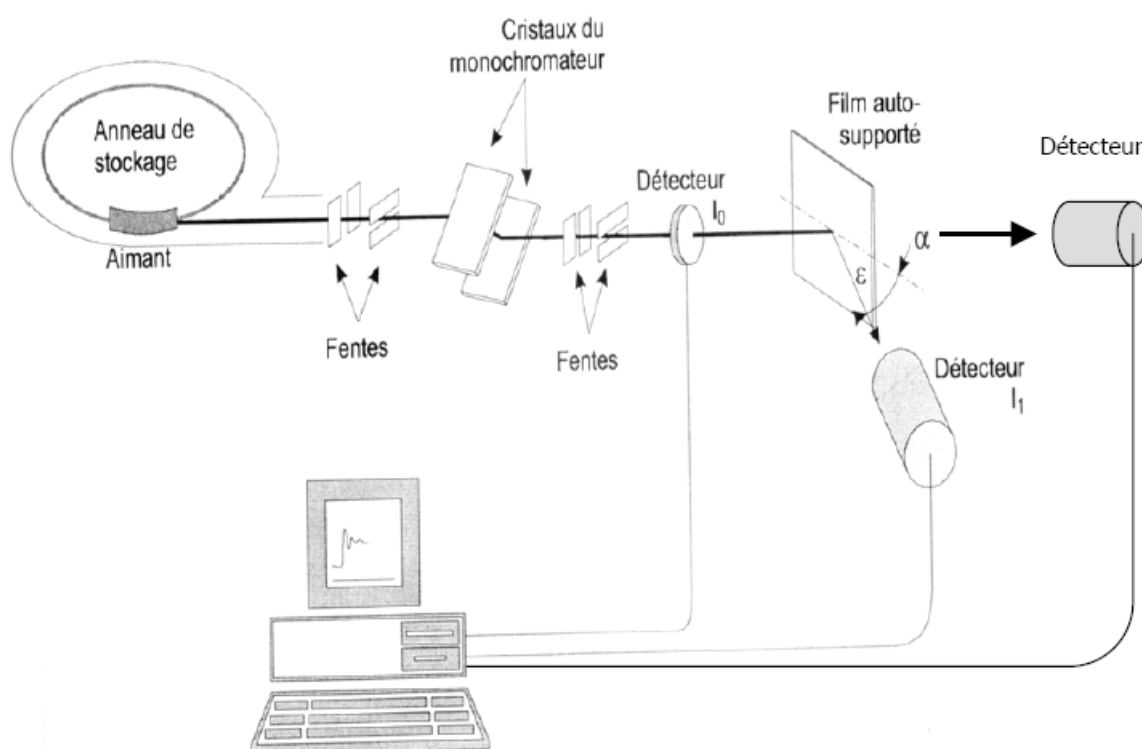


Figure A-3.3. Schéma d'une ligne d'absorption des rayons X.

Les spectres d'absorbance peuvent être enregistrés en mode transmission ou en mode fluorescence. Le mode transmission est une mesure directe du signal d'absorption ($I = I_0 \exp(-\mu x)$) tandis que le mode fluorescence est une mesure indirecte puisque ce sont des mesures de désexcitation radiative (fluorescence) que l'on mesure. Dans ce dernier cas, le signal est directement proportionnel à I/I_0 ($\ln(I/I_0) = \mu x$). Le mode transmission est utilisé pour les échantillons concentrés en élément absorbant alors que le mode fluorescence est utilisé pour les échantillons dilués ou concentrés dans une matrice peu absorbante. Il est impératif que l'élément étudié ne soit pas trop concentré en mode fluorescence afin d'éviter tout phénomène de réabsorption par l'échantillon.

3. LA MICRO-FLUORESCENCE X SUR RAYONNEMENT SYNCHROTRON (μ -SXRF) ET LA MICRO-EXAFS (μ -EXAFS)

Le dispositif d'expérience μ -SXRF et μ -EXAFS diffère d'une configuration d'EXAFS précédemment décrite par les éléments de focalisation du faisceau X et le système de balayage associé. Nos expériences en μ -SXRF et μ -EXAFS ont été effectuées sur la ligne 10.3.2 de l'ALS, située à la sortie d'un aimant de courbure. Le système de focalisation repose essentiellement sur des miroirs courbes (disposition de Kirkpatrick-Baez) qui permettent de focaliser un faisceau de rayons X (4-12 keV) sur quelques micromètres. Le monochromateur, composé de quatre cristaux, situé après les miroirs, peut être déplacé afin de permettre l'utilisation du faisceau blanc focalisé pour les expériences en microfluorescence X. La détection se fait en mode fluorescence X avec un détecteur solide SiLi. Les spectres obtenus par μ EXAFS sont traités de façon identique aux spectres obtenus par EXAFS.